

Titre: Application d'une nouvelle technologie de détection enzymatique pour le suivi en quasi-temps réel de la dynamique d'Escherichia coli dans des eaux récréatives
Title:

Auteur: Margot Cazals
Author:

Date: 2019

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Cazals, M. (2019). Application d'une nouvelle technologie de détection enzymatique pour le suivi en quasi-temps réel de la dynamique d'Escherichia coli dans des eaux récréatives [Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal].
Citation: PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/3946/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/3946/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Sarah Dorner
Advisors:

Programme: Génies civil, géologique et des mines
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Application d'une nouvelle technologie de détection enzymatique pour le suivi
en quasi-temps réel de la dynamique d'*Escherichia coli* dans des eaux
récréatives**

MARGOT CAZALS

Département des génies civil, géologique et des mines

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie Civil

Juin 2019

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé:

**Application d'une nouvelle technologie de détection enzymatique pour le suivi
en quasi-temps réel de la dynamique d'*Escherichia coli* dans des eaux
récréatives**

présenté par **Margot CAZALS**

en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Jonathan JALBERT, président

Sarah DORNER, membre et directrice de recherche

Elmira HASSANZADEH, membre

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier ma directrice de recherche Sarah Dorner pour sa confiance, et toutes les belles opportunités qu'elle m'a offertes dans le cadre de ce projet. Je n'aurais jamais imaginé que mes premiers pas dans l'univers de la recherche me porteraient si loin.

Merci également à Jean-Baptiste Burnet pour son soutien quotidien et ses précieux conseils tout au long du projet, et pour m'avoir permis de découvrir plus en détail le monde de la recherche.

Je tiens bien sûr à remercier toute l'équipe technique, Yves, Jacinthe, Julie, Mireille et Tetiana pour leur aide et tous leurs conseils, autant pour le terrain que pour les manipulations au laboratoire. Un grand merci à Laura Razafinjanahary pour son aide pour tout l'administratif. J'ai aussi une petite attention particulière pour tous mes amis de la Chaire. Grâce à vous tous je me suis sentie entièrement à ma place dans l'équipe et je vous en remercie.

J'aimerais adresser un grand merci à Adèle Lunati pour son aide technique et son soutien moral toute la session d'été 2018, sans tous nos fous rires le terrain m'aurait paru bien long !

Je pense aussi à tous mes amis de Polytechnique Montréal, ainsi que mes amis restés en France, pour leur soutien dans cette aventure, je sais que vous êtes les meilleurs !

Et enfin, j'aimerais remercier mes parents Carol et Christophe, et ma petite sœur Clémence, qui m'ont toujours soutenue dans tous mes projets et qui m'ont donné le courage de traverser l'océan pour réaliser mes rêves. Sans votre amour je ne serai jamais arrivée jusqu'ici.

ACKNOWLEDGMENTS

I would like to give a special tēnā koutou to Dr Rebecca Stott, Valerio Montemezzani and Stephan Heubeck, Sonya Song, and all the members of NIWA Hamilton for their warm welcome and all their precious advices, you all taught me so much!

RÉSUMÉ

La contamination fécale des eaux de surface reste l'une des premières causes de maladies d'origine hydrique dans le monde. Les réglementations relatives aux eaux récréatives diffèrent selon les pays, mais la majorité impose des normes exprimées en concentrations maximales acceptables d'*Escherichia coli*, encore considérée comme le meilleur organisme indicateur de contamination fécale. Néanmoins, les techniques actuelles recommandées pour le suivi de la qualité microbiologique des eaux de surface sont encore essentiellement basées sur la culture, ce qui implique de longs délais (au moins 18h) entre l'échantillonnage et l'obtention des résultats. De plus, seuls des échantillonnages sporadiques sont recommandés dans les réglementations, limitant ainsi l'acquisition d'informations sur la dynamique et le devenir des contaminations fécales détectées. Certaines technologies entièrement automatisées ont été récemment conçues pour la détection rapide (moins de 4h) d'*E. coli* à travers la mesure d'une enzyme spécifique à la bactérie fécale, l'enzyme β -D-glucuronidase (GLUC). L'objectif de ce projet de maîtrise était d'améliorer la compréhension d'un tel signal enzymatique et de son lien avec les concentrations en *E. coli* cultivables, ainsi que d'étudier la possible application de cette technologie pour une gestion sécuritaire et efficace des eaux récréatives.

Au total, 5 sites ont été étudiés : 4 situés en bordure du fleuve Saint-Laurent au Québec et un situé sur la rivière Waikato en Nouvelle-Zélande. Une technologie enzymatique entièrement automatisée appelée ColiMinder® (VWM Solutions, Autriche) était déployée et des échantillons étaient prélevés pour des analyses par culture.

La comparaison des coefficients de variation des différentes techniques a mis en avant la meilleure répétabilité de la méthode enzymatique automatisée, avec des coefficients de variation de 11% et 3,1% contre plus de 80% pour le TECTA™ B16 par exemple, et ce pour deux niveaux de contamination différents. L'étude de l'évolution du ratio d'enzyme par bactérie cultivable a montré que ce dernier diminuait avec des concentrations en *E. coli* croissantes. Cette évolution serait due à une sous-estimation des concentrations en bactéries dans les environnements peu pollués par les méthodes de culture, notamment du fait de la plus grande proportion de bactéries en état VBNC (viable mais non cultivable) à cause de stress environnementaux plus importants.

Les corrélations linéaires tracées pour chaque site entre le signal enzymatique et les concentrations en *E. coli* cultivables ont mis en lumière l'impact qu'ont le site (matrice d'eau, sources de

contamination fécale...) et le plan d'échantillonnage (protocole et fréquence de prélèvement d'échantillons) sur ces relations, avec des coefficients de corrélation allant de 0,0036 à 0,68. De plus, toutes ces corrélations présentaient des pentes positives inférieures à 1, aussi dues à une sous-estimation par les méthodes de culture des concentrations de bactéries dans les environnements peu pollués.

Deux analyses comparatives ont également été menées entre les méthodes de culture et la technologie enzymatique automatisée. La première, faite à l'aide de matrices de confusion, a permis la définition de seuils d'activité enzymatique en Unités de Fishman Modifiées (mUFM/100mL) équivalents aux seuils en *E. coli* cultivables fournis dans les réglementations des eaux récréatives. Les seuils finalement fixés ont été de 3,1; 3,4; 3,9 et 5mUFM/100mL pour les sites Qc1, Qc2 et NZ respectivement, ce dernier ayant un seuil d'alerte et un seuil d'action. La seconde étude comparative des décisions de gestion de plage par les deux méthodes considérait le délai de 24h relatif aux méthodes de culture, ainsi que le facteur chance. Des kappas de Cohen (κ) ont ainsi été calculés en comparant les résultats enzymatiques du jour $i-1$ et jour i aux résultats de la culture du jour $i-1$ (résultats connus au jour i). Les κ variaient de -0,14 à 0,65 entre GLUC jour i et culture jour $i-1$ indiquant un changement de la qualité de l'eau en 24h. Au contraire, un accord supérieur au hasard a été trouvé pour les échantillons prélevés concomitamment, avec des κ entre 0,43 et 1, apportant ainsi une première preuve de la fiabilité des technologies enzymatiques automatisées pour le suivi de la qualité des eaux des sites récréatifs. Finalement, un suivi lors d'un évènement de pluie avec surverse d'égouts a démontré la capacité de la technologie enzymatique rapide et automatisée à réaliser un suivi en quasi temps réel de l'évolution de la qualité microbiologique de l'eau et du devenir des contaminations fécales pour une gestion active des plages.

ABSTRACT

Fecal contamination of freshwaters remains one of the main causes of waterborne diseases worldwide. Recreational waters' regulations vary between countries but most of them fix beach action values in concentrations of *Escherichia coli*, which is still considered as the best faecal indicator organism. However, current techniques recommended for the monitoring of the microbiological quality of surface waters are essentially based on culture, with inherent long delays of at least 18h between sampling and results. Moreover, sporadic sampling is most often recommended by regulations, limiting the acquisition of knowledge on dynamics and fate of faecal contaminations detected. Some entirely automated and rapid technologies (results in less than 4h) for the online enzymatic detection of *E. coli* have then been designed. The objective of this master's project was to better understand the enzymatic signal given by one of these technologies, its link with culturable *E. coli* concentrations in various water matrices, as well as the possible application of this technology for a safe and efficient recreational water management.

5 sites have been studied in total: 4 located on the banks of the Saint-Lawrence river in Québec, and one located on the Waikato river in New-Zealand. An entirely automated enzymatic technology called ColiMinder® (VWM Solutions, Austria) was deployed and samples were taken for culture analyses.

The comparison of coefficients of variation of the different methods used showed that the enzymatic technology had a better repeatability for two different levels of contamination, with coefficients of variation of 11% and 3.1% against more than 80% for the TECTA™ B16 device for instance. The evolution of the ratio GLUC/culturable *E. coli* was investigated, and we found that this ratio decreased with increasing concentrations of *E. coli*. This could be due to an underestimation of the bacteria concentrations in less polluted environments by culture-based methods, mainly because of the higher proportion of VBNC (Viable But Non Culturable) cells in these environments because of more stressful environmental conditions.

Linear regressions plotted for each site between the enzymatic signal and culturable *E. coli* concentrations showed that site (water matrix, sources of faecal contamination...) and sampling plan (protocol and frequency) impacted them, with R^2 ranging from 0,0036 to 0,68. Moreover, all the slopes of these relationships were lower than 1, also because of the underestimation of *E. coli* concentrations in less polluted environments by culture-based methods.

Two comparative analyses have been conducted between culture-based methods and the automated enzymatic technology used for this project. The first analysis was based on the calculation of confusion matrices and allowed us to define beach action values for the enzymatic activity expressed in Modified Fishman Units (mMFU/100mL) equivalent to those defined in recreative waters' regulations in culturable *E. coli*. The thresholds were finally fixed at 3.1, 3.4, 3.9 and 5mMFU/100mL for the sites Qc1, Qc2 and NZ respectively, the last having an alert and an action threshold. The second comparative study was an exceedance agreement analysis considering the 24h delay of the culture-based methods and chance in the beach management decisions agreement. Cohen's kappa (κ) was calculated comparing Day $i-1$ and Day i enzymatic signal to Day $i-1$ culture results (known on Day i). κ ranged from -0.14 to 0.65 between Day i GLUC and Day $i-1$ *E. coli* showing a change in the microbiological quality of water in 24h. Conversely, an agreement higher than the one expected just by chance was obtained between enzymatic and culture-based methods for samples collected simultaneously, with κ ranging from 0.43 to 1. This gave a first evidence of the reliability of the enzymatic automated technologies for the monitoring of the quality of recreative waters. Finally, a monitoring done during a rain and combined sewer overflow event illustrated the capacity of the rapid automated technology to do a near-real time monitoring of the evolution and fate of a faecal contamination for an active beach management.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
ACKNOWLEDGMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XV
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	3
2.1 Indicateurs de contamination fécale	3
2.1.1 Qu'est-ce qu'un indicateur fécal et pourquoi en a-t-on besoin ?	3
2.1.2 <i>E. coli</i> comme indicateur fécal	4
2.2 Normes et législations	8
2.2.1 Eaux de consommation	8
2.2.2 Eaux récréatives	12
2.3 Techniques pour la détection de contamination fécale dans l'eau	19
2.3.1 Méthodes standards	19
2.3.2 Méthodes en développement	28
2.3.3 Méthodes enzymatiques	29
2.3.4 Comparaison des technologies de suivi sur site	33
CHAPITRE 3 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE.....	39
CHAPITRE 4 MATÉRIEL ET MÉTHODES	41

4.1	Sites étudiés.....	41
4.1.1	Site québécois 1.....	42
4.1.2	Site québécois 2.....	43
4.1.3	Sites dans la Grande région de Montréal	44
4.1.4	Rivière Waikato, Nouvelle-Zélande.....	44
4.2	Méthodes standards de quantification d' <i>Escherichia coli</i>	46
4.2.1	Colilert.....	46
4.2.2	Filtration sur membrane	46
4.2.3	TECTA™ B16	49
4.3	Méthode enzymatique automatisée : ColiMinder®	50
4.3.1	Présentation générale.....	50
4.3.2	Signal en phase soluble	52
4.4	Traitement des données.....	52
4.4.1	Calculs de base	52
4.4.2	Expérience de répétabilité	53
4.4.3	Analyses par définition de seuils limites.....	54
CHAPITRE 5	RÉSULTATS	58
5.1	Analyse du signal du ColiMinder®.....	58
5.1.1	Expérience de répétabilité	58
5.1.2	Signal en phase soluble et son impact sur les corrélations entre les méthodes.....	61
5.1.3	Ratios GLUC/ <i>E. coli</i>	62
5.2	Application du ColiMinder® aux eaux récréatives.....	63
5.2.1	Corrélations linéaires.....	63
5.2.2	Analyses par définition de seuils limites.....	66

5.3	Suivi d'un évènement, Grande région de Montréal	73
CHAPITRE 6 DISCUSSION		75
6.1	Compréhension du signal du ColiMinder®	75
6.1.1	Expérience de répétabilité	75
6.1.2	Signal en phase soluble	76
6.1.3	Ratios.....	77
6.2	Application du ColiMinder® aux eaux récréatives.....	79
6.2.1	Corrélations linéaires.....	79
6.2.2	Analyses par définition de seuils limites.....	83
6.3	Suivi quasi en continu d'un évènement pluvieux avec le ColiMinder®.....	86
CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS		90
BIBLIOGRAPHIE		93
ANNEXES		106

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1: Tableau comparatif des normes d'eau potable au Québec, Canada, États-Unis, Nouvelle-Zélande, Union Européenne, ainsi que les recommandations de l'OMS.....	9
Tableau 2.2: Tableau comparatif des normes pour les eaux récréatives au Québec, Canada, États-Unis, Nouvelle-Zélande, Union Européenne, ainsi que les recommandations de l'OMS. MG : moyenne géométrique, STV : valeur seuil statistique, UFC : unités formant colonies	14
Tableau 2.3: Avantages et inconvénients des méthodes de culture, adapté de World Health Organization et OECD (2003).....	22
Tableau 2.4: Tableau comparatif des technologies ColiMinder®, Tecta™ B16, LiqID, BACTcontrol et Fluidion	36
Tableau 4.1: Comparaison des trois géloses utilisées pour la culture d' <i>E. coli</i>	48
Tableau 4.2 : Analyses réalisées pour l'expérience de répétabilité.....	53
Tableau 4.3: Table d'interprétation du coefficient κ de Cohen, adaptée de McHugh (2012).	57
Tableau 5.1: Répétabilité moyenne entre opérateurs, échantillon A.....	60
Tableau 5.2: Répétabilité moyenne entre opérateurs, échantillon B	60
Tableau 5.3 : Matrice de confusion finale, site Qc1.....	68
Tableau 5.4: Résultats de l'analyse d'accord dans la gestion de plages de la culture et de la détection enzymatique, site Qc1	69
Tableau 5.5 : Matrice de confusion finale, site Qc2 (n = 196 points).....	70
Tableau 5.6: Résultats de l'analyse d'accord dans la gestion de plages de la culture et de la détection enzymatique, site Qc2 (n = 39 points).....	71
Tableau 5.7: Matrice de confusion finale, site NZ (n = 257 points)	72
Tableau 5.8 : Résultats de l'analyse d'accord dans la gestion de plages de la culture et de la détection enzymatique, site NZ (n = 37 points)	72

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1: Schéma de la réaction de β -D-glucuronidase et du MUGlu	31
Figure 4.1: Situation géographique des sites étudiés	42
Figure 4.2: ColiMinder® installé sur le site Qc2 durant l'été 2018.....	43
Figure 4.3: Sites d'échantillonnage A (a) et B (b).....	44
Figure 4.4: Photos de la rivière Waikato (a) et du site d'étude (b).....	45
Figure 4.5: Matériel de filtration sur membrane, Nouvelle-Zélande	47
Figure 4.6: Photos du TECTA™ B16 (a) et de son écran une fois les analyses terminées (b).....	49
Figure 4.7: Schéma du ColiMinder®	51
Figure 4.8: Photos de ColiMinder® sur différents sites.....	51
Figure 4.9: Montage pour la répétabilité du ColiMinder®, échantillon A.....	54
Figure 5.1: Coefficients de variation des différentes techniques de dénombrement pour les échantillons A (bleu) et B (vert). TC : Coliformes Totaux, EC : <i>E. coli</i>	59
Figure 5.2: Comparaison des corrélations entre filtration sur membrane et signal enzymatique avec (A) et sans signal 0,22 μ m (B), site NZ (n=23 points).....	61
Figure 5.3: Comparaison des corrélations entre Colilert et signal enzymatique avec (A) et sans signal 0,22 μ m (B), site NZ (n=62 points)	62
Figure 5.4: Évolutions du ratio GLUC/ <i>E. coli</i> en fonction des concentrations d' <i>E. coli</i> cultivables. A : site Qc2 : $y = -0,6823x + 0,0175$, $R^2 = 0,86$, B : site Qc1 (bleu = composite 1 : $y = -0,8317x - 0,0098$, $R^2 = 0,74$, orange = composite 2 : $y = -0,4378x - 0,6702$, $R^2 = 0,52$, gris = ponctuel 1 : $y = -0,4606x - 0,6906$, $R^2 = 0,54$, jaune = ponctuel 2 : $y = -0,4539x - 0,6917$, $R^2 = 0,54$).	62
Figure 5.5: : Corrélation linéaire entre GLUC et <i>E. coli</i> cultivables, site Qc1, tous échantillons confondus (n=167 points).....	64
Figure 5.6: Corrélation linéaire entre GLUC et <i>E. coli</i> cultivables, site Qc1. A : échantillon composite 1 (n=45 points), B : échantillon composite 2 (n=45 points), C : échantillon ponctuel 1 (n=38 points), D : échantillon ponctuel 2 (n=39 points).	64

Figure 5.7: Corrélation linéaire site Qc2 (n=194 points)	65
Figure 5.8: Corrélations linéaires Rivière Waikato (noir : Colilert, gris : filtration sur membrane, n=28 points).....	66
Figure 5.9: Évolutions temporelles du signal du ColiMinder®, de la concentration en <i>E. coli</i> et de la turbidité lors d'un évènement de pluie avec surverse dans la grande région de Montréal .	73
Figure 5.10: Corrélation linéaire entre les résultats enzymatiques et ceux du dénombrement par la culture pendant un évènement de pluie dans la grande région de Montréal (n=28 points)....	74

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

4-MUG (ou MUGlu)	4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
Cg	copies génomiques
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DVC	Direct Viable Count
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FACS	Tri de cellules par fluorescence
FISH	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization ou Hybridation in situ en fluorescence
FTM	Fermentation en Tubes Multiples
GLUC	β -D-glucuronidase
GM	Moyenne géométrique
ICC-qPCR	Integrated Cell Culture Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction
IFA	Immunofluorescence
MAC	Microbial Assessment Category
NIWA	National Institute of Water and Atmospheric research
NPP	Nombre le Plus Probable
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONPG	Ortho-nitrophényl- β -galactoside
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMA	Propidium Monoazide

qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction (aussi real-time polymerase chain reaction)
RFLP	Polymorphisme de taille de fragments de restriction
SIC	Sanitary Inspection Category
STV	Valeur seuil statistique
UFC	Unités Formant Colonies
UFM	Unités de Fishman Modifiées
UNICEF	United Nations International Children’s Emergency Fund (Fonds des Nations Unis pour l’Enfance)
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency
VBNC	Viable But Non-Culturable
VWM Solutions	Vienna Water Monitoring Solutions
WHO	World Health Organization

LISTE DES ANNEXES

Annexe A Résumé de la démarche scientifique.....	106
--	-----

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Peu de citoyens de pays développés se préoccupent de l'accès à l'eau potable, celle-ci étant disponible en bouteilles ou au robinet de leur cuisine. Ce n'est malheureusement pas le cas partout dans le monde. On estime qu'encore aujourd'hui 2 milliards de personnes utilisent une source d'eau contaminée par des fèces pour s'abreuver (World Health Organization, 2019). Dans leur dernier rapport conjoint de 2017, l'UNICEF et l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) rappelaient que 844 millions d'humains n'avaient pas accès à un service de base d'eau potable, et que 2,3 milliards de personnes vivaient sans installation sanitaire comme des toilettes ou des douches (World Health Organization (WHO) & the United Nations Children's Fund (UNICEF), 2017). Ces personnes sont donc amenées à se laver et se baigner dans des sources d'eaux douces dont la qualité n'est pas suivie et qui peuvent être contaminées par des déjections animales et humaines. Or la contamination par des matières fécales est la plus préoccupante source de contaminants microbiologiques en eau potable (UNICEF, 2017). Elle est notamment le vecteur de nombreuses maladies comme le choléra ou des diarrhées, ces dernières étant encore une des principales causes de la mort de jeunes enfants à travers le monde (Bain et al., 2014).

Les méthodes actuelles de détection des microorganismes pathogènes sont généralement complexes et longues, c'est pourquoi il n'est pas possible de toutes les appliquer en routine pour le suivi de la qualité des eaux potables ou récréatives. Des microorganismes indicateurs de contamination fécale ont alors été définis, comme la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*), et sont recherchés dans chaque pratique de suivis de qualité microbiologique des eaux. Cependant, les méthodes actuellement employées nécessitent, à cause de l'étape de culture, de longs délais (18h minimum) avant d'avoir connaissance des résultats. Il est alors souvent trop tard pour agir en cas de contamination. La protection des consommateurs et usagers s'en trouve donc fragilisée. De nombreux scientifiques et organismes s'accordent ainsi pour dire qu'il est nécessaire de passer au contrôle en continu sur site, notamment en ce qui concerne les eaux récréatives (Odonkor & Ampofo, 2013; Ryzinska-Paier et al., 2014). Plusieurs technologies, basées non pas sur la culture mais sur des méthodes enzymatiques, ont ainsi été développées afin de réduire le temps d'analyse.

Les principaux résultats obtenus lors de ce projet de maîtrise sont présentés dans les sept chapitres qui composent ce mémoire. Le Chapitre 2 est une revue de littérature rassemblant les principales informations sur la bactérie *Escherichia coli* et son utilisation comme indicateur de contamination

fécale dans l'eau, les normes pour les eaux potables et récréatives dans différentes régions du monde, ainsi que des renseignements sur les méthodes de détection dans l'eau de différents microorganismes, en insistant sur les technologies enzymatiques actuellement sur le marché. Les objectifs et hypothèses de recherche issus de la revue de littérature et associés au projet sont ensuite présentés dans le Chapitre 3. Le Chapitre 4 compile les informations sur les sites étudiés, les méthodes d'analyse microbiologiques employées et les méthodes d'analyse des données appliquées pendant le projet. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Chapitre 5, tandis que leur discussion et leur comparaison aux données trouvées dans la littérature sont présentées dans le Chapitre 6. Finalement, les conclusions tirées des observations faites lors du projet, de même que des recommandations et des pistes de recherche pour de futurs projets sont exposées au Chapitre 7.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Indicateurs de contamination fécale

L'origine principale des maladies d'origine hydrique est la contamination des eaux de consommation ou récréatives par des matières fécales, animales ou humaines. Le principal risque sanitaire est alors l'ingestion d'eau contaminée par des fèces et contenant des microorganismes pathogènes (Bain et al., 2014). Les méthodes pour déterminer la qualité microbiologique de l'eau sont donc principalement orientées vers la détection de ce type de pollution biologique.

2.1.1 Qu'est-ce qu'un indicateur fécal et pourquoi en a-t-on besoin ?

Des centaines de microorganismes pathogènes aquatiques sont aujourd'hui connus. Il est impossible de tous les chercher dans chaque échantillon d'eau, cela représenterait un investissement trop grand d'efforts, de temps et d'argent (Elliot & Colwell, 1985). Pour remédier à cela, des organismes indicateurs ont été définis, notamment pour détecter la présence de contamination fécale (Wu et al., 2011).

Les premiers questionnements et critères relatifs à la stratégie à employer pour assurer l'accès à une eau saine remontent aux années 1890 (Edberg, Rice, Karlin, & Allen, 2000). Afin de choisir l'organisme qui protégerait le mieux la santé des usagers, plusieurs critères ont été apportés à la définition de « l'indicateur idéal » de contamination fécale (Elliot & Colwell, 1985; Santé Canada, 2012a). Celui-ci doit être présent uniquement dans les matières fécales animales ou humaines et absent des eaux non contaminées. Par ailleurs, il doit être présent dans les eaux polluées par des fèces lorsque des organismes pathogènes sont également présents, mais il doit l'être en plus grande quantité que ces derniers. L'indicateur idéal ne doit pas pouvoir se multiplier dans les matrices d'eaux analysées, mais doit pouvoir survivre au moins aussi longtemps que les organismes pathogènes les plus résistants, dans l'eau mais aussi face à la désinfection. Une corrélation doit de plus exister entre les concentrations en indicateur et le niveau de contamination fécale ainsi que le risque pour les usagers de tomber malades. Il est préférable que l'indicateur ne soit pas lui-même pathogène pour les humains (Ishii & Sadowsky, 2008). Enfin, des techniques rapides, simples et abordables de détection et de quantification de cet organisme indicateur doivent être disponibles. Certains scientifiques soulignent qu'il serait aussi avantageux que l'indicateur permette de

distinguer les contaminations d'origine humaine des contaminations animales (Cabral, 2010). Évidemment, aucun organisme ne répond à tous les critères cités ci-dessus, celui s'en approchant le plus étant le microorganisme pathogène lui-même, mais là encore sa présence ne signifierait pas pour autant que d'autres organismes pathogènes soient présents (Elliot & Colwell, 1985).

La première utilisation de bactéries comme indicateurs de la qualité sanitaire de l'eau remonte à l'association de *Klebsiella pneumonia* et *Klebsiella rhinoscleromatis* à la présence de selles humaines par Von Fritsch en 1880. Peu après, Grace et Percy Frankland ont lancé la première campagne de suivi de la qualité bactériologique de l'eau à Londres en 1885. C'est également ce couple qui, en 1891, argumenta que la détection d'organismes caractéristiques des eaux usées dans des eaux destinées à la consommation était une preuve d'une contamination de ces dernières (Odonkor & Ampofo, 2013). Depuis, le groupe des indicateurs fécaux a été défini comme le groupe d'organismes indiquant la présence de contamination fécale, mais seulement la possible présence de microorganismes pathogènes (Odonkor & Ampofo, 2013). Plusieurs études ont finalement conclu que les meilleurs indicateurs de contamination fécale, dans les eaux récréatives et de consommation, étaient les entérocoques et la bactérie fécale *Escherichia coli* (Santé Canada, 2012a; U.S. Environmental Protection Agency, 2012).

2.1.2 *E. coli* comme indicateur fécal

Escherichia coli (communément appelée *E. coli*) est une bactérie membre de la famille des *Enterobacteriaceae* anaérobie facultative, Gram négative, existant sous la forme d'un bâtonnet d'environ 2µm de long. Son habitat naturel est le gros intestin des animaux à sang chaud, où elle permet notamment la production des vitamines K₁ et K₂, et empêche que des bactéries pathogènes ne s'y installent (Odonkor & Ampofo, 2013). Elle a été découverte en 1885 par Theodor Escherich dans les selles de nouveaux nés. Il s'est alors aperçu qu'au bout de quelques semaines après la naissance, cette bactérie capable de faire coaguler le lait était la plus présente dans leur côlon (Cabral, 2010). Sa température de croissance optimale est de 37°C. Son temps de survie dans l'environnement est estimé entre 4 et 12 semaines, en présence d'une microflore modérée et à une température de 15 à 18°C (Edberg et al., 2000). La concentration moyenne d'*E. coli* dans les selles humaines oscille entre 10^{7.5} et 10^{7.7} UFC/g de selles (Cabral, 2010) les UFC étant les Unités Formant Colonies. La plupart des souches d'*E. coli* sont inoffensives pour l'Homme, mais certaines, comme la souche O157:H7 découverte en 1982, sont pathogènes pour les humains.

Plusieurs symptômes y sont associés, allant du porteur sain jusqu'au syndrome hémolytique ou la mort (Mead & Griffin, 1998).

La bactérie *E. coli* a été proposée pour la première fois comme microorganisme indicateur de la sécurité sanitaire de l'eau par Theobald Smith dans les années 1890 en Grande-Bretagne. Malheureusement, à cette époque aucune technique de détection et quantification adéquate de cette bactérie n'était connue, et les coliformes totaux et fécaux ont alors été employés comme substituts (Edberg et al., 2000). En 1892, Schardinger soutient la théorie de Smith selon laquelle la présence d'*E. coli* dans l'eau serait une indication de contamination fécale et donc de la possible présence d'agents pathogènes entériques. En 1893, la première méthode de dénombrement d'*E. coli* par culture sur une gélose contenant du lactose est employée par des bactériologistes, elle est appelée la méthode Wurtz (Odonkor & Ampofo, 2013). Une douzaine d'années plus tard, en 1905, MacConkey présente le milieu de culture MacConkey permettant la croissance sélective des bactéries capables de fermenter le lactose et de tolérer des sels biliaires (MacConkey, 1905). Depuis, plusieurs études ont montré qu'*E. coli* est le seul coliforme à provenir de façon sûre des systèmes gastrointestinaux des animaux à sang chaud (Edberg et al., 2000). D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), *Escherichia coli*, et par extension les coliformes thermotolérants, sont les organismes considérés comme s'approchant le plus de l'indicateur idéal de contamination fécale pour les eaux douces (Havelaar, Blumenthal, Strauss, Kay, & Bartram, 2001). Ainsi, *E. coli* est depuis de nombreuses années utilisée pour la détection de contamination fécale dans la nourriture (Doyle, 1991) et dans l'eau (Odonkor & Ampofo, 2013).

E. coli est encore aujourd'hui considérée comme le meilleur indicateur de contamination fécale par de nombreux chercheurs et organismes. Ainsi, les critères de classification des eaux récréatives aux États-Unis sont basés sur des concentrations en *E. coli*, et ce depuis 1986, car il a été prouvé qu'elle permettait une meilleure prédiction du risque de maladies gastrointestinales d'origine hydrique que les coliformes fécaux (Francy, Myers, & Metzker, 1993; Wade et al., 2006). Cette même année une équation prédisant le risque de contracter une infection gastrointestinale à partir des concentrations en *E. coli* dans l'eau a été développée par l'agence de protection de l'environnement américaine. *E. coli* est aussi considérée comme le meilleur indicateur de pollution fécale récente dans les systèmes d'approvisionnement en eau potable au Canada (Santé Canada, 2012b). En effet, même si la présence seule d'*E. coli* dans l'eau n'y assure pas la présence de microorganismes pathogènes, elle indique tout de même un risque élevé de la présence d'autres

microorganismes d'origine fécale et de maladie gastrointestinale (Odonkor & Ampofo, 2013; Wade et al., 2006). Des méthodes de détection et quantification d'*E. coli* relativement simples, spécifiques, sensibles et abordables sont disponibles, et *E. coli* est par ailleurs plus spécifique que les coliformes fécaux, car elle représente la bactérie principale de ce groupe hétérogène dont certains microorganismes ne sont pas d'origine fécale mais seulement aquatique ou tellurique (George et al., 2000). De plus, même si ces méthodes ne permettent pas de distinguer les souches pathogènes d'*E. coli* parmi toutes les bactéries présentes, les *E. coli* non pathogènes sont toujours présentes en plus grand nombre dans les selles, et les souches pathogènes ne sont jamais présentes lorsque les *E. coli* génériques sont absentes. La présence de ces dernières est donc un bon indice de contamination fécale et de la possible existence de microorganismes pathogènes fécaux dans l'échantillon, mais pas spécifiquement d'*E. coli* pathogènes (Santé Canada, 2013). D'autres travaux ont permis de montrer que les survies dans l'environnement et face à la désinfection des *E. coli* pathogènes et des souches non infectieuses sont semblables (Santé Canada, 2013). Dans les eaux récréatives, *Escherichia coli* a également une survie similaire à celle des bactéries entériques pathogènes (Santé Canada, 2012a). Enfin, Edberg et al. (2000) ont comparé des données sur différents indicateurs potentiels pour l'eau potable, comme les entérocoques ou certains coliphages, et ont conclu qu'*E. coli* était le meilleur indicateur biologique de la sûreté de l'eau potable.

Néanmoins, même si la présence d'*E. coli* dans des échantillons est depuis longtemps synonyme de présence de contamination fécale, elle n'en reste pas moins éloignée de l'indicateur fécal parfait. Parmi les points faibles souvent relevés, il y a le fait qu'*E. coli* survit mal dans l'environnement une fois hors des intestins, et ne peut donc indiquer la présence que de contaminations relativement récentes (Odonkor & Ampofo, 2013). Par ailleurs, elle est souvent moins abondante que d'autres bactéries dans les eaux naturelles. Les protozoaires et virus sont moins sensibles aux différents stress environnementaux que les bactéries de l'espèce *Escherichia coli*, ces dernières pourraient donc ne plus être détectées alors que certains agents pathogènes seraient toujours présents (Santé Canada, 2012a). Le comportement des coliformes fécaux est généralement similaire à celui de nombreuses bactéries pathogènes, mais est beaucoup moins représentatif de celui de virus et parasites (New Hampshire Department of Environmental Services, 2003). D'autres différences de comportement entre *E. coli* et plusieurs microorganismes pathogènes ont ainsi été soulignées. Une étude de Stott et al. (2011) a démontré des dynamiques différentes entre *E. coli* et *Campylobacter* dans un ruisseau lié à un bassin versant dans une zone d'élevage bovin. Les pics de concentration

d'*E. coli* avaient lieu presque simultanément de ceux de turbidité, généralement avant les pics de concentration de *Campylobacter* qui se produisaient lorsque le débit atteignait son maximum. Wu et al. (2011) ont pour leur part montré qu'*E. coli* n'était pas plus susceptible d'être corrélée avec certains agents pathogènes que d'autres indicateurs comme les coliformes fécaux, les entérocoques ou *Clostridium perfringens*, et que la qualité des corrélations dépendait beaucoup du nombre de données disponibles. D'autres études ont souligné l'absence totale ou de très faibles corrélations entre les indicateurs fécaux comme *E. coli* et les protozoaires (Santé Canada, 2012c). Ainsi, Dorner et al. (2007) ont montré que les corrélations entre *E. coli* et microorganismes pathogènes (*Clostridium perfringens*, *Giardia*) étaient faibles, et ont ainsi conclu qu'*E. coli* n'était pas toujours un indicateur fiable pour la qualité microbiologique de l'eau, notamment pour les cours d'eaux en aval d'un bassin versant. Enfin, des souches d'*E. coli* ont récemment été découvertes dans des environnements tropicaux vierges (Odonkor & Ampofo, 2013), mais aussi dans des effluents d'usines de pâtes et papiers sans qu'aucune contamination fécale n'ait été trouvée (Gauthier & Archibald, 2001). Des études ont alors montré que ces souches sont en réalité naturalisées, et qu'elles peuvent exister dans le sable ou les sédiments de bassins versants côtiers (World Health Organization, 2018b). D'autres bactéries *E. coli* naturellement présentes parmi les populations bactériennes des sols ont aussi été signalées (Cabral, 2010). Leur présence dans ces environnements ne serait donc plus entièrement synonyme de contamination fécale.

Finalement, bien que de récentes études aient montré qu'*Escherichia coli* pouvait s'intégrer aux populations bactériennes des sols, sables, algues et sédiments de milieux tropicaux, subtropicaux et tempérés (Ishii & Sadowsky, 2008), elle n'en reste pas moins l'indicateur de contamination fécale privilégié. Les concentrations en *E. coli* et en entérocoques sont celles qui permettent d'avoir une meilleure corrélation avec le risque de contracter une maladie d'origine hydrique, pour les eaux douces ou salées respectivement (Ishii & Sadowsky, 2008; U.S. EPA, 1986a; Wade et al., 2006). Pour pallier les différentes faiblesses détaillées ci-dessus, plusieurs scientifiques envisagent donc de combiner les concentrations en *E. coli* et celles en entérocoques pour estimer les risques sanitaires (Cabral, 2010). Cependant, comme les seuils actuellement définis dans de nombreux pays sont en nombres de colonies d'*E. coli*, d'autres chercheurs appuient l'importance de développer des technologies de suivi en continu des concentrations d'*E. coli* dans l'eau (Odonkor & Ampofo, 2013), ou d'utiliser les méthodes enzymatiques de détection de β -D-glucuronidase pour avoir un suivi avec une meilleure résolution temporelle (Cabral, 2010).

2.2 Normes et législations

Comme de nombreux paramètres liés à l'eau, la qualité microbiologique est aussi réglementée par des normes et des législations, qui diffèrent selon les pays et l'utilisation faite de l'eau. L'Organisation Mondiale de la Santé recommande ainsi que les niveaux d'indicateurs de contamination bactérienne dans les eaux souterraines, récréatives et potables soient suivis. Des seuils maximaux en *E. coli*, coliformes fécaux ou thermotolérants ont par exemple été fixés dans 103 pays et territoires différents à travers le monde (World Health Organization, 2018a).

2.2.1 Eaux de consommation

Les premières normes pour l'eau potable de l'OMS ont été publiées en 1958 dans la première édition de « The Guidelines for Drinking-water Quality » (World Health Organization, 2018a). L'OMS a depuis également publié une analyse des différentes législations de l'eau potable à travers le monde, et il en ressort que pour 103 pays et territoires, un des critères de potabilité est qu'aucune bactérie *E. coli* ou coliforme fécal ou thermotolérant ne soit détectable dans 100mL de l'eau en question (World Health Organization, 2018a). La limite pour les paramètres microbiologiques autres que les bactéries hétérotrophes est généralement de 0 dans 100mL, même si de nombreuses réglementations tolèrent que des coliformes soient occasionnellement détectés. Ce rapport souligne également que plusieurs pays, en plus de valeurs seuils pour des indicateurs, ont ajouté un énoncé proche de celui de la Directive Européenne sur l'eau potable, et spécifiant que toute eau potable doit être exempte de tout microorganisme ou parasite qui constitue un potentiel danger pour la santé humaine, en nombre ou en concentration (Conseil de l'Union Européenne, 1998).

Le Tableau 2.1 rassemble les normes de qualité microbiologique des eaux potables pour le Québec, le Canada, les États-Unis, la Nouvelle-Zélande, l'Union Européenne et les recommandations de l'OMS. Les normes canadiennes et néo-zélandaises posent un seuil maximal en *E. coli*, tandis que l'Union Européenne légifère une limite en bactéries coliformes, et que les États-Unis et le Québec imposent des seuils de coliformes totaux. Il est à noter tout de même que la norme québécoise précise qu'aucune bactérie *E. coli* ne doit être détectée. Enfin, une proposition de révision de la directive actuelle de l'Union Européenne a été acceptée le 1 février 2018 mais les seuils en *E. coli* n'étaient pas concernés.

Tableau 2.1: Tableau comparatif des normes d'eau potable au Québec, Canada, États-Unis, Nouvelle-Zélande, Union Européenne, ainsi que les recommandations de l'OMS

Pays / Organisation	Seuils	Lieu et fréquence de l'échantillonnage	Référence
Québec	<p>0 microorganisme pathogène</p> <p>Et 0 <i>E. coli</i></p> <p>Et moins de 10 coliformes totaux/100mL</p> <p>Et au moins 90% des échantillons sur 30 jours doivent être exempts de coliformes totaux</p>	<p>De 2 à plus de 100 échantillons par mois selon la taille de la population desservie.</p> <p>Prélèvements à des endroits représentatifs du réseau, dont la moitié et ses extrémités.</p>	(MDDELCC, 2014)
Canada	<p>0 <i>E. coli</i> détectable/100mL</p>	<p>Sortie de l'usine de traitement, au moins une fois par semaine, et au moins 4 échantillons par mois dans les installations de stockage et dans le réseau de distribution</p>	(Santé Canada, 2012b)
États-Unis	<p>0 coliforme total et 0 coliforme fécal</p> <p>Moins de 5% des échantillons du mois doivent être positifs aux coliformes totaux (ou ≤ 1 échantillon/mois si moins de 40 échantillons par mois)</p>	<p>Prélèvements sur des sites représentatifs de la qualité de l'eau tout au long du réseau de distribution, au moins un échantillon par mois.</p>	(U.S. EPA, 2009)

Tableau 2.1: Tableau comparatif des normes d'eau potable au Québec, Canada, États-Unis, Nouvelle-Zélande, Union Européenne, ainsi que les recommandations de l'OMS (suite)

Nouvelle-Zélande	< 1 <i>E. coli</i> /100mL	<p>En sortie d'usine de potabilisation : entre échantillonnage quotidien et bimensuel, selon le traitement appliqué et la taille de la population desservie</p> <p>Dans le réseau de distribution : échantillonnage à des points constants (stations de pompage, robinets, réservoirs de service...), entre 3 et 100 échantillons par trimestre selon la taille de la population.</p>	(Ministry of Health, 2008)
Union Européenne	<p>0 <i>E. coli</i>/100mL</p> <p>(Pour eau en bouteille ou dans des conteneurs : 0 <i>Escherichia coli</i>/250mL)</p>	<p>Au moins 4 contrôles de routine et 1 contrôle complet par an, selon le volume quotidien d'eau produit ou distribué dans une zone de distribution. Les points de prélèvement sont fixés par les autorités compétentes de chaque pays membre.</p>	(Conseil de l'Union Européenne, 1998)

Tableau 2.1: Tableau comparatif des normes d'eau potable au Québec, Canada, États-Unis, Nouvelle-Zélande, Union Européenne, ainsi que les recommandations de l'OMS (suite)

Organisation Mondiale de la Santé	0 <i>E. coli</i> ou coliforme thermotolérant / 100mL	Dans le système de distribution, au moins 12 échantillons par an selon la taille de la population concernée. Les points d'échantillonnage dépendent de chaque site d'approvisionnement en eau.	(World Health Organization, 2011)
--------------------------------------	--	--	--------------------------------------

2.2.2 Eaux récréatives

Les eaux récréatives sont des étendues d'eau, mobiles ou non, avec lesquelles les personnes entrent en contact primaire lors d'activités récréatives comme la baignade, le kayak ou les sports nautiques (Ministry for the Environment of New Zealand, 2009). Le contact primaire a lieu par ingestion ou immersion dans l'eau. Les eaux récréatives sont réparties en deux catégories ("9213 Recreational Waters," 2017). La première inclut les eaux naturelles qui ne peuvent être désinfectées et qui sont sujettes à des sources ponctuelles ou diffuses de contamination. La seconde catégorie concerne les infrastructures utilisant de l'eau traitée et qui doivent être désinfectées en continu, cette classe rassemble aussi bien des eaux à usage récréatif (piscines) que thérapeutique (spas, bains).

Escherichia coli est actuellement utilisée comme critère d'acceptabilité d'accès aux eaux récréatives dans de nombreux pays et dans la Directive Européenne de la gestion de la qualité des eaux de baignade (Parlement Européen et Conseil de l'Union Européenne, 2006; World Health Organization, 2018b). Cette dernière est la seule législation à imposer à la fois des concentrations limites en *E. coli* et en entérocoques pour tous les sites suivis. Cependant, ces lignes directrices européennes sont à la fois définies par rapport au 90^{ème} et au 95^{ème} percentiles, ce qui porte à confusion et est peu compréhensible pour les usagers selon l'OMS. Celle-ci recommande donc de conserver les seuils en *E. coli*, car son suivi depuis déjà plusieurs années permet d'avoir les tendances historiques de chaque site, de garder les quatre niveaux de classification en les basant tous sur le 95^{ème} percentile, et d'augmenter de 4 à 20 le nombre minimum d'échantillons à analyser par année (World Health Organization, 2018b). Les nouveaux seuils d'action seraient alors de 1789 UFC/100mL en eau intérieure et 993 UFC/100mL en eau côtière, au lieu des 900 UFC/100mL et 500 UFC/100mL actuellement recommandés.

En ce qui concerne les lignes directrices de qualité des eaux récréatives néo-zélandaises, deux critères de classification sont définis par site. Le premier représente la catégorie de qualité microbiologique du site. Cet identificateur est nommé le Microbiological Assessment Category (MAC). Le second critère classe les sites selon les principales sources de contamination fécale identifiées et du risque estimé qu'elles représentent pour les usagers, il se nomme le Sanitary Inspection Category (SIC). Combinés, le MAC et le SIC donnent le Suitability for Recreation Grade, soit le niveau de convenance du site pour les activités récréatives. Cinq niveaux ont ainsi été définis, allant de « very good » à « very poor » (MfE & MoH, 2003).

La méthode de filtration sur membrane puis culture sur milieu de culture solide est la technique la plus recommandée par les autorités, notamment aux États-Unis avec le milieu mTEC modifié, en Nouvelle-Zélande avec le milieu mTEC, ou au Québec avec la gélose mFC BCIG, comme utilisée lors de ce projet. Une autre méthode reconnue dans certaines législations, comme en Nouvelle-Zélande, est la méthode Colilert (IDEXX, États-Unis), grâce à sa facilité d'utilisation notamment. Les techniques citées ci-dessus sont présentées plus en détail en section 2.3.1.1 de ce mémoire. Il est aussi à noter que les fréquences d'échantillonnage diffèrent également selon les pays, allant d'un échantillon par semaine en Nouvelle-Zélande, à seulement quelques échantillons par saison de baignade au Québec. Le Tableau 2.2 rassemble les normes pour les eaux récréatives définies au Québec, au Canada, aux États-Unis, en Nouvelle-Zélande et dans l'Union Européenne. Il contient également les recommandations actuelles de l'OMS.

Tableau 2.2: Tableau comparatif des normes pour les eaux récréatives au Québec, Canada, États-Unis, Nouvelle-Zélande, Union Européenne, ainsi que les recommandations de l'OMS. MG : moyenne géométrique, STV : valeur seuil statistique, UFC : unités formant colonies

Pays / Organisation	Indicateur	Catégories de qualité et Seuils	Stratégie d'échantillonnage
Québec (MELCC, 2019)	<i>E. coli</i>	<p>Moyenne arithmétique d'échantillons composites :</p> <p>A – Excellente ≤ 20 UFC/100mL</p> <p>B – Bonne Entre 21 and 100 UFC/100mL</p> <p>C – Passable Entre 101 and 200 UFC/100mL</p> <p>D – Polluée ≥ 201 UFC/100mL</p>	<p>Échantillonnage entre la mi-juin et la fin août</p> <p>Au moins 2 échantillons</p> <p>Au moins 3 échantillons</p> <p>Au moins 5 échantillons</p> <p>Au moins 5 échantillons</p>
Canada (Santé Canada, 2012a)	<i>E. coli</i> ¹	<p>Moyenne géométrique (sur 5 échantillons ou plus) ≤ 200 <i>E. coli</i> /100mL pour contact primaire en eau douce</p> <p>Concentration maximale pour 1 échantillon = 400 <i>E. coli</i>/100mL</p>	<p>Au moins un contrôle hebdomadaire par site</p>

¹ Seuils basés sur des données épidémiologiques liant les concentrations en *E. coli* et l'incidence chez les baigneurs de maladies gastro-intestinales (10 à 20 cas pour 1000 baigneurs)

Tableau 2.2: Tableau comparatif des normes pour les eaux récréatives au Québec, Canada, États-Unis, Nouvelle-Zélande, Union Européenne, ainsi que les recommandations de l'OMS. MG : moyenne géométrique, STV : valeur seuil statistique, UFC : unités formant colonies (suite)

États-Unis (U.S. Environmental Protection Agency, 2012)	<i>E. coli</i> ou entérocoques ²	<p>Eaux récréatives, avec contact primaire (immersion et ingestion) :</p> <p>Moyenne géométrique ≤ 100 UFC/100mL d'<i>E. coli</i> sur 30 jours et moins de 10% d'échantillons au-dessus de STV = 320 UFC/100mL (risque de 32 pour 1000)</p> <p>Ou 1 échantillon < 190 UFC/100mL</p> <p>Moyenne géométrique ≤ 126 UFC/100mL de <i>E. coli</i> sur 30 jours et moins de 10% d'échantillons au-dessus de STV = 410 UFC/100mL (risque de 36 pour 1000)</p> <p>Ou 1 échantillon < 235 UFC/100mL</p>	Au moins 1 échantillon par semaine. MG estimée sur une période de 30 jours
---	--	--	--

² Seuils fondés sur des études épidémiologiques de l'U.S. EPA

Tableau 2.2: Tableau comparatif des normes pour les eaux récréatives au Québec, Canada, États-Unis, Nouvelle-Zélande, Union Européenne, ainsi que les recommandations de l'OMS. MG : moyenne géométrique, STV : valeur seuil statistique, UFC : unités formant colonies (suite)

Nouvelle-Zélande (MfE & MoH, 2003)	<i>E. coli</i> , 95 ^{ème} percentile ³	Rang MAC : A : ≤ 130 <i>E. coli</i> /100mL B : entre 131 et 260 <i>E. coli</i> /100mL C : entre 261 et 550 <i>E. coli</i> /100mL D : > 550 <i>E. coli</i> /100mL		Grade MAC au long terme réévalué tous les 5 ans.
	<i>E. coli</i> ³	Acceptable	< 260 UFC/100mL	Analyse d'un échantillon par semaine pendant la saison de baignade (de novembre à mars), prélevé entre 8h et 18h.
		Alerte	> 260 UFC/100mL	
		Action	> 550 UFC/100mL	

³ Seuils en *E. coli* dérivés d'un risque estimé d'infection par *Campylobacter*

Tableau 2.2: Tableau comparatif des normes pour les eaux récréatives au Québec, Canada, États-Unis, Nouvelle-Zélande, Union Européenne, ainsi que les recommandations de l'OMS. MG : moyenne géométrique, STV : valeur seuil statistique, UFC : unités formant colonies (suite)

Union Européenne (Parlement Européen et Conseil de l'Union Européenne, 2006)	<i>E. coli</i> Analyses d'entérocoques aussi requises	Eaux intérieures :		1 échantillon avant le début de la saison de baignade, et 3 pendant. Moins d'un mois doit s'écouler entre les échantillonnages.
		Excellente	95 ^{ème} percentile < 500 UFC/100mL	
		Bonne	95 ^{ème} percentile < 1000 UFC/100mL	
		Satisfaisante	90 ^{ème} percentile < 900 UFC/100mL	
		Eaux côtières ou de transition :		
		Excellente	95 ^{ème} percentile < 250 UFC/100mL	
		Bonne	95 ^{ème} percentile < 500 UFC/100mL	
		Satisfaisante	90 ^{ème} percentile < 500 UFC/100mL	

Tableau 2.2: Tableau comparatif des normes pour les eaux récréatives au Québec, Canada, États-Unis, Nouvelle-Zélande, Union Européenne, ainsi que les recommandations de l'OMS. MG : moyenne géométrique, STV : valeur seuil statistique, UFC : unités formant colonies (suite)

Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization, 2003)	Entérocoques 95 ^{ème} percentile	<p>A : $\leq 40/100\text{mL}$</p> <p>B : entre 41 et 200/100mL</p> <p>C : entre 201 et 500/100mL</p> <p>D : $> 500/100\text{mL} \rightarrow$ risque significatif</p>	
--	--	---	--

2.3 Techniques pour la détection de contamination fécale dans l'eau

2.3.1 Méthodes standards

De nos jours, il n'existe aucune méthode unique englobant la collecte et l'analyse d'un échantillon d'eau pour tous les microorganismes pathogènes d'intérêt. Cela est en partie dû aux différences physiques entre les agents pathogènes, leur faible concentration dans l'eau et la présence d'inhibiteurs dans celle-ci (Straub & Chandler, 2003). Par ailleurs, pour avoir des résultats fiables, les méthodes de détection doivent être spécifiques, sensibles, répétables, reproductibles, rapides, peu chères et si possible automatisées (Ramirez-Castillo et al., 2015). La sensibilité est définie comme étant la capacité à détecter de faibles nombres d'organismes cibles, tandis que la spécificité est l'aptitude à ne détecter que l'organisme cible. Par ailleurs, la répétabilité concerne les résultats d'un même laboratoire alors que la reproductibilité est le fait d'obtenir les mêmes résultats entre différents laboratoires. Aux différents critères cités ci-dessus peuvent aussi s'ajouter la simplicité de l'analyse, et les besoins en équipement et en temps pour la mettre en pratique (World Health Organization, 2018b).

Le choix de la méthode à employer dépend de l'information que l'on souhaite avoir. Les objectifs se divisent en trois catégories de méthodes : (1) les méthodes absence/présence pour savoir si certains microorganismes sont présents, (2) les méthodes de dénombrement pour savoir combien de microorganismes pathogènes ou indicateurs sont présents et pouvoir se référer aux législations, et enfin, (3) les méthodes pour savoir si les microorganismes sont viables ou non, infectieux ou non (Straub & Chandler, 2003).

Les paragraphes qui suivent présentent de façon non exhaustive différentes méthodes utilisées pour détecter les bactéries, les virus et les protozoaires dans des échantillons d'eau.

2.3.1.1 Bactéries

Les analyses microbiologiques d'eaux récréatives ont depuis longtemps été basées sur des méthodes de culture, dans un bouillon (liquide) ou sur une gélose (solide), dans des conditions d'incubation optimales (World Health Organization, 2018b). Pour ce faire, le même schéma est en général suivi : (1) concentration de l'échantillon (filtration sur membrane, centrifugation, enrichissement), (2) isolation de la bactérie cible des autres microorganismes (culture sur milieu

sélectif, méthodes immunologiques de détection), et parfois (3) confirmation (tests biochimiques, observations au microscope) (Santé Canada, 2012a). Il faut au moins 18h pour obtenir les résultats des méthodes de culture, le temps pour les bactéries de croître et former des colonies (World Health Organization, 2018b). Les résultats obtenus sont en nombre de bactéries par volume d'échantillon analysé (en général Unités Formant Colonies (UFC/100mL)). Cette unité permet d'estimer le nombre de microorganismes présents dans un échantillon grâce au décompte des colonies présentes sur un milieu de culture solide après incubation. Les méthodes diffèrent selon le niveau de contamination de l'échantillon afin de maintenir de bonnes sensibilité et sélectivité (World Health Organization & OECD, 2003).

Pour la concentration de l'échantillon, c'est généralement la filtration sur membrane qui est employée : les bactéries sont captées sur des filtres de 47mm de diamètre dont le diamètre des pores varie entre 0,22 et 0,45 μm . Les filtres sont ensuite placés sur des géloses avant incubation (World Health Organization & OECD, 2003). Les conditions d'incubation sont choisies afin d'optimiser la croissance des bactéries désirées tout en inhibant le développement des autres bactéries (comme une température d'incubation à 44°C, la présence d'un antibiotique dans le milieu, ou la nécessité d'exprimer une certaine enzyme pour être détecté) (World Health Organization, 2018b). Chaque méthode de culture a sa propre gamme de détection qui dépend du volume filtré, de la sélectivité du milieu, de l'organisme cible (donc de la taille et de la forme des colonies) et de la matrice d'eau étudiée (U.S. Environmental Protection Agency, 2002; World Health Organization & OECD, 2003).

Une autre méthode de culture, notamment recommandée par Santé Canada pour les eaux récréatives, est la fermentation en tubes multiples (FTM) (Santé Canada, 2012a). L'OMS recommande également cette technique comme test de présence/absence sur des échantillons ne devant pas contenir de coliformes (World Health Organization & OECD, 2003). Cette technique comporte trois étapes et permet d'obtenir des résultats en Nombre le Plus Probable par 100mL (NPP/100mL) (U.S. EPA, 1986b), soit une estimation statistique du nombre de bactéries présentes dans l'échantillon. La première étape est le test préliminaire. Une série de dilutions est effectuée sur l'échantillon à analyser et celles-ci sont placées dans des tubes à fermentation contenant un milieu de culture sélectif pour les coliformes (souvent le lauryl tryptose broth). Cinq tubes doivent être préparés au minimum pour avoir une précision satisfaisante. Les tubes sont alors incubés à 35°C +/- 0,5°C. S'il y a formation de gaz dans un tube dans les 48h (+/- 3h), alors ce tube est

considéré positif au test préliminaire, indiquant la possible présence de coliformes. La seconde étape est l'essai de confirmation. Le contenu des tubes positifs au test préliminaire est utilisé pour inoculer des tubes de fermentation contenant le milieu Brilliant Green Lactose Bile (Sigma-Aldrich, 2019). L'inoculation doit se faire le plus tôt possible après la formation de gaz à la première étape. Les tubes sont ensuite incubés à 35°C (+/- 0,5°C) pendant 48h (+/- 3h). Si du gaz est formé alors le tube est positif au test de confirmation. Enfin, la dernière étape est le test complémentaire, il se fait sur les tubes positifs à la seconde étape ou comme contrôle de qualité sur 20% des échantillons analysés. Des boîtes de Petri contenant du bleu de méthylène d'éosine sont inoculées avec l'échantillon à analyser, et incubées pendant 24h (+/- 2h) à 35°C (+/- 0,5°C). Les colonies typiques sont ensuite transférées dans des tubes à fermentation contenant du bouillon de lauryl tryptose et sur des géloses inclinées contenant des nutriments. Le tout est incubé à 35°C (+/- 0,5°C) jusqu'à 48h (+/- 3h). Les géloses correspondant aux tubes dans lesquels du gaz a été formé sont ensuite colorées avec la coloration de Gram et observées au microscope. L'observation de bactéries en bâtonnets Gram négatives, et ne formant pas de spore confirme la présence de bactéries coliformes dans l'échantillon. Le nombre de tubes positifs par dilution peut ensuite être comparé à un tableau de conversion en NPP afin de connaître le nombre estimé de coliformes par 100mL d'échantillon (Santé Canada, 2012a). Les avantages de cette méthode correspondent à son applicabilité sur des échantillons pour lesquels la filtration sur membrane est impossible (trop turbides par exemple), et à l'emploi d'un milieu liquide qui facilite la récupération des microorganismes stressés. Cependant, cette méthode est très longue, surtout avec l'étape de confirmation, elle nécessite beaucoup de matériel, et le nombre obtenu n'est qu'une estimation, ce n'est pas le nombre exact de bactéries coliformes contenues dans l'échantillon (Santé Canada, 2012a). Deux méthodes de FTM ont été développées et approuvées par l'U.S. EPA pour les coliformes totaux mais elles concernent les biosolides de classe A et B. La méthode U.S. EPA 1680 impose l'utilisation de deux milieux différents tandis que la méthode U.S. EPA 1681 n'en comporte qu'un (U.S. EPA, 2006, 2010).

Les techniques de culture sont certes les plus recommandées pour détecter et dénombrer les bactéries dans l'eau, elles n'en présentent pas moins plusieurs défauts. Le premier est que les résultats ne sont pas connus avant au moins 18h, voire plusieurs jours, et une confirmation des résultats peut être nécessaire (Watkins & Jian, 1997). De plus, plusieurs études estiment que les milieux de culture ne permettent de détecter que 0,01 à 1% des bactéries présentes, et que la culture

sur milieux sélectifs empêche un bon rétablissement des bactéries ayant subi des stress environnementaux (Watkins & Jian, 1997; World Health Organization & OECD, 2003). Sachant que les échantillons environnementaux contiennent de nombreuses bactéries viables mais non cultivables (VBNC), notamment *E. coli*, cela peut aboutir à des faux-négatifs en culture (Ramirez-Castillo et al., 2015). L'OMS a ainsi listé les avantages et inconvénients de différentes méthodes de culture (World Health Organization & OECD, 2003). Le Tableau 2.3 en est adapté.

Tableau 2.3: Avantages et inconvénients des méthodes de culture, adapté de World Health Organization et OECD (2003).

Méthode	Filtration sur membrane et culture sur gélose	NPP avec culture en milieu liquide
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Gamme assez large de volumes pouvant être filtrés - La sensibilité augmente si le volume filtré augmente - Retire les impuretés solubles qui pourraient nuire à la croissance des organismes cibles <ul style="list-style-type: none"> - Résultat quantitatif - Bonne précision si le nombre de colonies est dans la gamme recommandée - Généralement pas besoin d'autres étapes de culture (économies de temps et d'argent) - Pour confirmation, l'isolation de colonies déjà séparées sur gélose est plus simple 	<ul style="list-style-type: none"> - Gamme assez large de volumes pouvant être filtrés <ul style="list-style-type: none"> - Possible sur tous les échantillons - Bons rétablissement et croissance des microorganismes stressés - Simple interprétation des résultats - Ne nécessite pas de compétences particulières - Précision et sensibilité augmentées selon le volume, le nombre de dilutions et de répliques
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> - Des particules solides et des produits chimiques peuvent interférer avec la croissance des bactéries une fois captés par la membrane <ul style="list-style-type: none"> - La qualité des membranes varie - Impossible sur des échantillons trop turbides - Identification des colonies typiques pas toujours aisée - Parfois difficile de prévoir la bonne dilution pour être dans la gamme recommandée 	<ul style="list-style-type: none"> - Faible précision en routine avec peu de répliques - Étape de confirmation généralement nécessaire (augmentation des coûts et du temps) - Si la sélectivité du milieu est faible alors les organismes cibles sont masqués par d'autres - Présence d'inhibiteurs dans l'environnement <ul style="list-style-type: none"> - Pour isoler des souches pures, d'autres cultures sur géloses sont nécessaires - Les coûts et le besoin d'espace augmentent pour de gros volumes à analyser <ul style="list-style-type: none"> - Si est seulement utilisée en test présence/absence, alors aucune information n'est fournie sur le niveau de contamination

Il existe trois méthodes de culture standardisées à l'international pour la détection et la quantification d'*E. coli* dans l'eau. La méthode ISO 9308-3:1998 définit une méthode miniaturisée pour la détection et le dénombrement d'*E. coli* dans les eaux usées ou de surface par inoculation

dans un milieu liquide. Les résultats sont obtenus en NPP/100mL. Cette méthode, applicable également dans les eaux contenant beaucoup de matières en suspension, n'est cependant pas utilisable pour les eaux potables ou les eaux dont les recommandations sont inférieures à 15 UFC/100mL (ISO, 1998). La méthode ISO 9308-2:2012 régit l'utilisation des technologies Colilert, Quanti-Tray et Quanti-Tray 2000 développées par la société IDEXX pour la détection et la quantification en NPP/100mL d'*E. coli* et des coliformes, et valables pour tous les types d'eau douce (ISO, 2012). La dernière méthode est la ISO 9308-1:2014 qui permet le dénombrement d'*E. coli* et des coliformes par filtration sur membrane et culture sur une gélose chromogénique. Néanmoins cette méthode n'est adéquate que pour des eaux avec peu de bactéries, comme les eaux potables ou désinfectées, mais pas pour les eaux de surface (ISO, 2014). Les méthodes ISO 9308-I avant modification et 9308-3 sont d'ailleurs recommandées dans la Directive Européenne pour les eaux récréatives (Parlement Européen et Conseil de l'Union Européenne, 2006).

Les techniques de culture les plus récentes pour le domaine de l'eau impliquent l'utilisation de substances chromogènes ou fluorogènes dans les géloses pour identifier les bactéries, évitant une étape ultérieure de confirmation, et permettant ainsi un gain de temps non négligeable. Cependant, des techniques alternatives remplacent peu à peu la culture, comme la capture sélective à l'aide d'anticorps, les techniques moléculaires ou encore la cytométrie de flux (Watkins & Jian, 1997).

La technique moléculaire la plus employée pour la détection d'ADN et d'ARN est la Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR), aussi appelée test d'amplification des acides nucléiques. Cette technique d'amplification in vitro de matériel génétique a été inventée en 1985 par K. Mullis, récipiendaire du prix Nobel en 1993 (Voge, 2002). Un cycle de PCR est une succession de trois étapes (Trigui & Prévost, 2019). La première est l'étape de dénaturation : l'échantillon est chauffé à 95°C pendant environ 5 minutes afin de séparer les brins d'ADN ou d'ARN. La seconde étape est l'hybridation des amorces et de la polymérase aux brins séparés. Les amorces sont des paires de bases d'initiation de la synthèse de matériel génétique, elles délimitent la zone à amplifier en se fixant aux extrémités de la séquence voulue (aussi appelée amplicon). Cette étape se fait entre 40 et 65°C selon la longueur et la séquence des amorces (Bibliomer, 2009). L'étape finale d'un cycle est l'élongation pendant laquelle la polymérase ajoutée à l'échantillon (généralement la Taq Polymérase, résistante aux températures élevées) synthétise le brin complémentaire d'ADN ou d'ARN à partir de l'amorce. Cette étape se déroule à 72°C qui est la température optimale pour la Taq Polymérase. 30 cycles sont habituellement réalisés pour une analyse par PCR, chaque cycle

de dure environ 1 minute et double le nombre de copies dans l'échantillon. Cela permet d'obtenir plus d'une centaine de millions de copies de la séquence recherchée, qui peut ensuite être détectée par électrophorèse. La PCR permet par exemple, en amplifiant l'ARNr 16s des procaryotes, d'obtenir des informations sur la diversité des populations bactériennes présentes dans des échantillons environnementaux. Les avantages de cette technologie sont qu'elle est spécifique, sensible, rapide et peu cher. Toutefois cependant elle ne fournit pas d'information sur la viabilité des cellules présentes, le volume analysé est faible, et des inhibiteurs sont présents naturellement dans l'environnement (Shanks et al., 2016). Par ailleurs, il y a des risques de contamination par du matériel génétique externe à l'échantillon, pouvant conduire à des faux-positifs ou des faux-négatifs. C'est pourquoi il est recommandé de réaliser les manipulations post et pré-PCR dans des lieux différents (Bibliomer, 2009). Enfin, des réactions de PCR en réplica donnent souvent des taux d'amplicons différents (Poitras & Houde, 2002).

Une technique dérivée de la PCR est la PCR en temps réel (ou qPCR). Celle-ci permet d'amplifier de courts fragments d'ADN ou d'ARN tout en suivant la quantité à chaque instant. Pour cela, des sondes se fixant sur l'ADN double brin (comme le SYBR) ou simplement sur une séquence précise (comme Taqman et Beacon), et qui ne fluorescent qu'une fois fixées, sont ajoutées. La fluorescence émise, une fois mesurée, permet de connaître sans faire d'électrophorèse la quantité d'amplicons générés, cette dernière étant corrélée à la quantité d'ADN initialement présente (Bibliomer, 2009). La PCR en temps réel permet de supprimer les variabilités de la PCR et d'en quantifier rapidement et spécifiquement le produit. Son autre avantage est qu'elle est entièrement automatisée et peut donc être utilisée pour des analyses à grande échelle (Poitras & Houde, 2002). La qPCR utilisant du Propidium Monoazide (PMA) permet par exemple de distinguer les cellules viables (dont la membrane n'est pas endommagée) en amplifiant seulement l'ADN de ces cellules (Trigui & Prévost, 2019). Certaines études se sont penchées sur l'utilisation de la qPCR pour détecter et quantifier les *E. coli* dans des eaux de surface. Ainsi, Walker et al. (2017) ont montré que le gène *ybbW* était le mieux adapté car il permet la détection de toutes les souches d'*E. coli* testées sans interférence de la part d'autres microorganismes comme *Shigella*, *Vibrio*, *Klebsiella* ou d'autres *Escherichia*. Ils soulignent aussi que l'emploi de colorants de viabilité (comme le PMA) améliorent la précision de la qPCR. La PCR en temps réel permet ainsi une détection et une quantification plus rapide que la culture mais sa limite de détection reste haute, notamment parce que les techniques d'extraction et d'isolation d'ADN ou d'ARN environnementaux manquent

encore d'efficacité et de fiabilité (Walker et al., 2017). Enfin, Santé Canada (2012a) rapporte que plusieurs techniques de qPCR ont été décrites pour des bactéries pathogènes comme *E. coli* O157:H7, mais que d'autres études sont nécessaires pour développer des méthodes standardisées peu chères, fiables et précises.

Une autre technologie d'imagerie moléculaire est l'hybridation in situ en fluorescence (FISH). Le protocole pour l'analyse d'échantillons d'eau comprend la filtration de l'échantillon sur une membrane, la fixation des bactéries sur celle-ci, puis la perméabilisation des membranes, l'hybridation des sondes fluorescentes, et enfin un lavage pour retirer les sondes non fixées avant examen au microscope (World Health Organization & OECD, 2003). Les sondes utilisées se fixent sur une partie spécifique des chromosomes, d'ARNm ou ARNr, ou vont être spécifiques à certaines espèces ou à un genre. Plusieurs sondes émettant différentes couleurs peuvent être utilisées ensemble. L'accessibilité et le nombre de cibles des sondes définissent l'amplitude du signal fluorescent mesuré. Les bactéries environnementales, souvent stressées ou manquant de nutriments sont généralement moins réactives. De plus, cette méthode n'est pas très sensible : plus de 100L d'échantillon doivent être filtrés pour avoir une précision de 1 cellule/100mL. Cependant, la technologie FISH présente l'avantage de ne pas utiliser de marqueurs radioactifs, diminuant ainsi le risque de contamination environnementale, et la technique Direct Viable Count (DVC) y a été adaptée afin de distinguer les cellules mortes et vivantes (Garcia-Armisen, Lebaron, & Servais, 2005). Finalement, d'autres techniques comme la microscopie optique, la microscopie par épifluorescence ou la cytométrie de flux permettent de détecter et quantifier des microorganismes après leur marquage avec une molécule fluorescente plus ou moins spécifique.

2.3.1.2 Virus

Les virus ne sont présents qu'en faible quantité dans les eaux, même contaminées. C'est pourquoi il est d'abord nécessaire de concentrer de grands volumes de l'échantillon à analyser, parfois jusqu'à plus de mille litres. Pour ce faire les méthodes d'ultrafiltration ou d'adsorption-élution sont les plus usitées, les premières présentant l'avantage de ne pas exiger d'élution et d'être indépendantes du pH (Santé Canada, 2012a, 2017).

Une fois l'échantillon concentré, les méthodes de détection sont souvent complexes, et les plus employées sont la culture cellulaire et la PCR, ou une association des deux, le choix dépend du virus ciblé et des caractéristiques propres à l'échantillon (Santé Canada, 2017). La culture cellulaire

reste la méthode la plus utilisée, et est le seul moyen pour détecter la présence de virus infectieux dans l'eau, et donc de prédire les risques pour la santé des usagers (Santé Canada, 2012a). Néanmoins, cette technique est laborieuse et très longue (jusqu'à plusieurs semaines avec les étapes de confirmation). Par ailleurs, elle n'est pas adaptée à tous les virus. En effet, tous les virus entériques ne se reproduisent pas à la même vitesse, et les concentrations des virus à croissance lente peuvent être sous-estimées (Fong & Lipp, 2005). Certains virus ne peuvent se reproduire en culture cellulaire ou produire un effet cytopathique permettant la détection de visu de l'infectiosité, entraînant ainsi une sous-estimation de la concentration virale (Santé Canada, 2017). Les virus peuvent également s'agréger et il n'existe pas de lignée cellulaire universelle pour la culture simultanée de tous les virus entériques connus (Fong & Lipp, 2005).

Les méthodes moléculaires utilisées pour la détection de virus entériques dans l'eau sont toutes basées sur la PCR (Santé Canada, 2012a). Pour cela, les virus sont lysés, c'est-à-dire que leur membrane est détruite, fragmentée, pour permettre la libération de leurs acides nucléiques avant l'ajout d'amorces et l'amplification des régions ciblées. Un signal positif peut ensuite être détecté par coloration, électrophorèse ou examen visuel, pour obtenir des résultats en copies génomiques par unité de volume (cg/L). La PCR présente l'avantage d'être rapide, spécifique et sensible si elle est bien conçue (Santé Canada, 2017). De plus, il existe des PCR pour la majorité des virus entériques d'intérêt, et grâce à la PCR multiplex plusieurs virus peuvent être détectés conjointement (Henegariu, Heerema, Dlouhy, Vance, & Vogt, 1997). Néanmoins, la PCR n'apporte aucune information sur l'infectiosité des virus détectés, et plusieurs substances présentes dans l'environnement comme les métaux lourds ou les acides humiques en inhibent les réactions (Fong & Lipp, 2005). Ces inhibiteurs peuvent être retirés des échantillons mais ce traitement supplémentaire entraîne une perte de sensibilité. Des méthodes dérivées de la PCR, comme la qPCR, existent pour quantifier les virus présents grâce à une courbe standard. Cependant, aucune technique normalisée n'est encore définie (Santé Canada, 2012a).

La culture cellulaire et la PCR peuvent aussi être combinées pour à la fois améliorer la détection des virus, différencier les virus infectieux de ceux qui ne le sont pas et diminuer la durée d'analyse. La sensibilité est également améliorée, la toxicité de la culture diminuée, et les effets des inhibiteurs potentiels sont atténués grâce à la dilution de ces derniers (Santé Canada, 2017). La technologie « Integrated Cell Culture Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction » (ICC-qPCR) en est un bon exemple. Elle a été utilisée avec succès pour la détection de virus infectieux dans de

nombreux environnements différents (Fongaro et al., 2015). Des méthodes comme l'immunocapture-PCR ont aussi été étudiées pour détecter les virus infectieux sans culture cellulaire (Santé Canada, 2017).

Finalement, il apparaît que les techniques de détection des virus dans l'eau sont complexes et ne peuvent donc pas être utilisées en routine, d'où l'emploi de microorganismes indicateurs comme *E. coli*.

2.3.1.3 Protozoaires

Deux techniques de détection de protozoaires ont été approuvées par l'U.S. EPA, elles concernent les protozoaires *Cryptosporidium* et *Giardia*. La méthode 1622 est pour la détection de *Cryptosporidium* seul, tandis que la méthode 1623 permet la détection conjointe de *Cryptosporidium* et *Giardia* (U.S. EPA, 2005a, 2005b). Cette dernière est la plus employée et a été approuvée pour les eaux de surface. Seuls les laboratoires d'analyse de qualité de l'eau avec du matériel spécifique et du personnel hautement qualifié peuvent être habilités à réaliser les analyses de protozoaires pathogènes (Santé Canada, 2012a). Les méthodes de détection des protozoaires comportent généralement quatre étapes : (1) prélèvement de l'échantillon, (2) filtration et élution, (3) concentration (centrifugation ou floculation) et purification (séparation immunomagnétique) et enfin, (4) détection des oocystes et kystes (Santé Canada, 2012a, 2012c).

Les techniques de détection des protozoaires sont l'immunofluorescence (IFA), la cytométrie de flux et la PCR. La plus employée de nos jours est l'immunofluorescence. Après la concentration et la purification de l'échantillon, une partie de celui-ci est déposée sur une lame de microscope, puis des anticorps ciblant des antigènes spécifiques sur les oocystes et kystes et marqués par fluorescence sont ajoutés (Santé Canada, 2012a). Après incubation, les lames sont lues à l'aide d'un microscope à immunofluorescence directe. Cette technique est très sensible mais requiert une certaine expertise, du matériel spécialisé, et une coloration est généralement nécessaire pour différencier les oocystes et kystes de certaines algues. Le DAPI est le colorant le plus usité pour cela (Santé Canada, 2012c).

Une autre technique de détection des protozoaires dans l'eau est la cytométrie de flux, plus particulièrement le tri de cellules par fluorescence (FACS). Cette technologie permet de distinguer les kystes des oocystes, et de les différencier des autres particules. Là encore, des anticorps marqués par fluorescence sont ajoutés à l'échantillon concentré avant de le passer dans le cytomètre. La

fluorescence des kystes et oocystes marqués est mesurée lorsqu'ils croisent le faisceau lumineux, et les particules sont ensuite triées et distribuées dans différents tubes (Santé Canada, 2012c). Cette technologie est rapide, très spécifique, très sensible et permet un criblage à haut débit (Hsu et al., 2005). Malgré tout, le personnel doit être formé à l'utilisation de cytomètres de flux, appareils très onéreux, et une étape de confirmation au microscope est aussi requise. Par ailleurs, des algues naturellement fluorescentes ou d'autres particules aussi reconnues par les anticorps marqués peuvent interférer avec les mesures. Enfin, la technique FACS est toujours en développement et n'est donc à ce jour pas employée pour les analyses de routine (Santé Canada, 2012c).

La méthode moléculaire la plus communément utilisée pour *Giardia* et *Cryptosporidium* est la PCR, parfois conjointement avec le polymorphisme de taille de fragments de restriction (RFLP) afin de discerner les espèces et génotypes de ces deux types de protozoaires (Lowery et al., 2001; Santé Canada, 2012a). La PCR est rapide, sensible, et peut être automatisée et combinée à la transcription inverse pour différencier les oocystes et kystes viables des non-viables. Néanmoins, de nombreux inhibiteurs de la PCR se trouvent dans l'environnement, seuls de petits volumes peuvent être analysés, et la lyse des kystes et oocystes est très difficile (Santé Canada, 2012c). Par ailleurs, la PCR reste une technologie coûteuse. D'autres méthodes moléculaires comme la qPCR ou la technologie FISH peuvent être employées, mais pour le moment les désavantages des techniques moléculaires sont trop importants pour les rendre adéquates à l'analyse d'échantillons d'eau. Pour cette raison, aucune méthode de détection moléculaire de *Giardia* et *Cryptosporidium* dans l'eau n'a encore été validée (Santé Canada, 2012c). En outre, aucune des méthodes actuelles citées ne fournit d'information sur l'infectiosité des kystes et oocystes. Des tests de degré de dékystement, l'utilisation de colorants fluorescents ou l'emploi de cultures cellulaires ou sujets animaux sont alors nécessaires (Santé Canada, 2012a).

2.3.2 Méthodes en développement

D'autres méthodes de détection de microorganismes dans les milieux aquatiques sont actuellement à l'étude. Parmi elles, on compte les biocapteurs et les laboratoires sur puces (ou micropuces).

Les biocapteurs possèdent deux composantes. La première est un récepteur biologique capable de détecter de façon spécifique un analyte cible (un anticorps, une enzyme ou les récepteurs d'une cellule par exemple). La seconde partie d'un biocapteur est un transducteur qui convertit les interactions biologiques créées en un signal physique mesurable (électrique, optique, thermique)

fournissant une quantification ou semi-quantification de l'organisme cible (Ramirez-Castillo et al., 2015). Les bénéfices des biocapteurs sont qu'ils sont miniatures, automatiques, déployables sur site, ils fournissent les données en temps réel avec des délais courts entre les analyses, et les échantillons n'ont pas besoin d'être conditionnés. Cependant, ils sont souvent sensibles aux variations de température, de pH et de plusieurs autres facteurs environnementaux. Leurs limites de détection sont encore souvent trop hautes pour l'application aux échantillons d'eau (World Health Organization & OECD, 2003).

Les laboratoires sur puce sont des combinaisons miniatures de capteurs et systèmes de microfluidique qui permettent un suivi en temps réel des concentrations. De par leur petite taille, ces dispositifs permettent des économies de réactifs et d'échantillon, ainsi qu'une détection rapide avec des limites de détection faibles. Ces techniques sont néanmoins limitées par le développement technologique, et doivent encore être testées dans différentes matrices d'eau avant de pouvoir être validées (Ramirez-Castillo et al., 2015). Des micropuces constituées de brins microscopiques d'ADN sur du verre pour permettre la détection et le génotypage de *Giardia* et *Cryptosporidium* ont ainsi été développées, mais d'autres études sont requises pour tester leur sensibilité et leur spécificité (Santé Canada, 2012c; Wang, Vora, & Stenger, 2004). Il semblerait donc que le futur de la microbiologie soit au développement de nouvelles méthodes automatiques, comme le prédisaient Watkins et Jian en 1997 : "Future microbiologists may not use culture but depend on the use of specific probes and sophisticated detection systems." (Watkins & Jian, 1997).

2.3.3 Méthodes enzymatiques

D'autres méthodes prometteuses développées depuis quelques années, notamment pour la détection de bactéries, sont les méthodes enzymatiques. Celles-ci sont basées non pas sur la détection directe d'un microorganisme, mais sur la détection et la quantification d'une enzyme spécifique à ce microorganisme. Elles ne mesurent donc pas la même chose que les méthodes de culture. Ces techniques ont été développées car il apparaît que les bactéries environnementales, à cause des nombreux stress qu'elles subissent, perdent souvent leur aptitude à former des colonies sur des milieux de culture. Les méthodes enzymatiques permettent donc aussi la détection des bactéries métaboliquement actives (ou viables) mais non cultivables (VBNC) contrairement à la culture (George et al., 2000). De plus, les techniques enzymatiques permettent des mesures beaucoup plus rapides (souvent moins de deux heures) ce qui en fait d'excellents outils de détection

et suivi de contamination fécale en quasi temps réel (George et al., 2000; Watkins & Jian, 1997). Parmi les méthodes enzymatiques les plus développées, il y a l'emploi de l'enzyme β -D-glucuronidase pour la détection et la quantification d'*E. coli*.

2.3.3.1 Présentation de β -D-glucuronidase

L'enzyme β -D-glucuronidase (GLUC) est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse des liaisons osidiques des β -D-glucuronides, afin qu'ils soient mieux éliminés via les reins. La GLUC de la bactérie *Escherichia coli* a été très étudiée, elle comporte 603 acides aminés, est similaire à 50% avec celle des humains, et la séquence du gène la codant est connue et employée en génie génétique (Arul et al., 2008). La β -D-glucuronidase est une enzyme inductible (Pardee & Prestidge, 1961), c'est-à-dire que sa production nécessite ou est stimulée par la présence d'une petite molécule spécifique nommée inducteur (généralement le substrat de l'enzyme ou un composé structuellement proche) (Farlex, 2019). Elle n'est donc pas détectable si l'inducteur n'est pas aussi présent dans le milieu. Il a été montré qu'entre 87 et 97% des bactéries *Escherichia coli* possèdent l'enzyme GLUC, notamment la majorité des souches environnementales, et sont donc détectables par méthode enzymatique (Rice, Allen, & Edberg, 1990). Cependant, la souche pathogène *E. coli* O157:H7 ne produit pas cette enzyme et n'est donc pas quantifiable par de tels tests. Par ailleurs, il a été montré que les β -D-glucuronidases des bactéries environnementales non ciblées (donc non *E. coli*) sont moins inductibles que celles d'*E. coli* (Tryland & Fiksdal, 1998). Pour toutes ces raisons, GLUC est maintenant utilisée comme un marqueur enzymatique pour la détection d'*E. coli* lors des contrôles de qualité microbiologique de l'eau (Rompré, Servais, Baudart, de-Roubin, & Laurent, 2002; Togo, Wutor, & Pletschke, 2006).

2.3.3.2 Principe

Les méthodes enzymatiques reposent sur le principe que, plutôt que de détecter un microorganisme en particulier, ce qui s'avère long et laborieux, il suffit de détecter une enzyme qui lui est spécifique. Les réactions enzymatiques, selon l'enzyme visée, sont spécifiques à une espèce, un genre ou un groupe, et sont sensibles et rapides (Rompré et al., 2002). Pour ce faire, un substrat spécifique à l'enzyme cible et modifié est injecté dans l'échantillon. Si l'enzyme est présente dans cet échantillon, elle va catalyser le clivage du substrat qui devient alors détectable car il produit un colorant, de la fluorescence ou un signal physique détectable et mesurable. Les méthodes enzymatiques sont le plus souvent basées sur des technologies optiques ou électrochimiques pour

mesurer la quantité d'enzyme présente (Fiksdal & Tryland, 2008). Les substrats modifiés employés pour les analyses d'échantillons d'eau sont généralement chromogènes ou fluorogènes et sont donc détectés par mesure optique (Rompré et al., 2002).

Pour ce qui est de la détection et quantification d'*E. coli* dans l'eau, c'est l'enzyme β -D-glucuronidase (présentée dans la section 2.3.3.1) qui a été choisie. Le substrat le plus usité est le 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide, abrégé en MUGlu ou 4-MUG (Rompré et al., 2002). Celui-ci, une fois clivé grâce à l'intervention de GLUC, devient fluorescent, surtout en milieu basique : sa fluorescence à un pH de 10 est ainsi 100 fois plus intense qu'à un pH neutre. Sa longueur d'onde d'excitation est de 365nm et il émet à 445nm (Sigma-Aldrich). La réaction est schématisée en Figure 2.1.

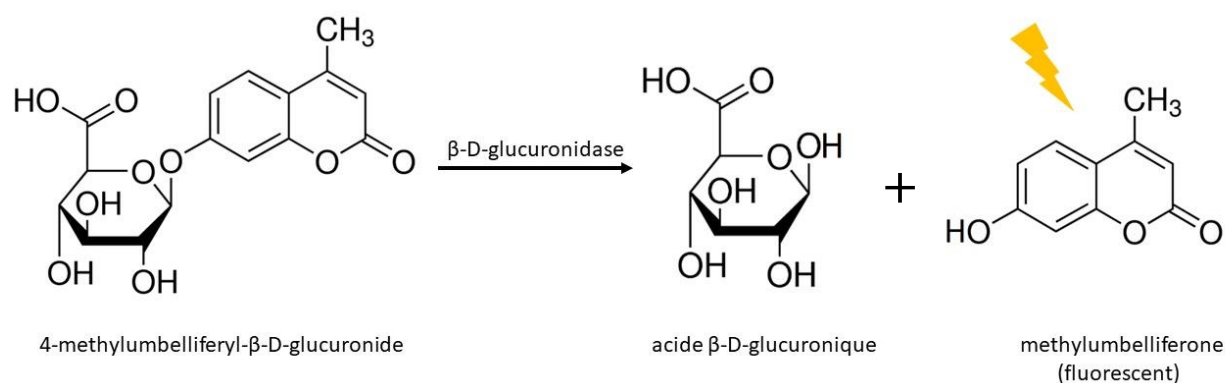


Figure 2.1: Schéma de la réaction de β -D-glucuronidase et du MUGlu

Les premiers protocoles d'essai de la β -D-glucuronidase concernaient la détection des coliformes fécaux dans les eaux marines (Muller-Niklas & Herndl, 1992) puis dans les eaux côtières de Bretagne (Fiksdal, Pommepuy, Caprais, & Midttun, 1994). George et al. (2000) ont ensuite appliqué ce test dans des eaux douces pour la première fois en 1999. Ils en ont optimisé les conditions : un pH de 6,9 et une température d'incubation de 44°C, une concentration finale de 150mg/L de MUGlu dans l'échantillon à analyser, un pH supérieur à 10 pour la mesure de fluorescence ainsi qu'une excitation à 365nm pour une émission à 445nm. Les résultats de tous les essais enzymatiques sont exprimés en quantité de matière produite par unité de temps et de volume. Plusieurs chercheurs ont depuis montré que l'utilisation de substrats modifiés chromogènes ou fluorogènes permettait d'avoir une détection plus rapide et plus précise (Manafi, Kneifel, & Bascomb, 1991; Rompré et al., 2002). Les méthodes pour détecter les microorganismes cibles sont en effet généralement basées sur des réactions métaboliques qui sont moins spécifiques que les

réactions enzymatiques, d'où une meilleure spécificité observée (Rompré et al., 2002). Cependant, les limites de détection de ce type de méthodes sont encore souvent trop hautes pour être appliquées sur des eaux potables, mais elles sont en accord avec les directives sur les eaux récréatives de nombreux pays, présentées en 2.2.2. L'autre problème généralement soulevé est la spécificité de ces techniques. En effet, comme explicité plus haut, *E. coli* n'est pas la seule bactérie à exprimer l'enzyme β -D-glucuronidase, et toutes les *E. coli* ne l'expriment d'ailleurs pas. Des interférences avec des organismes non-cibles sont donc possibles (Fiksdal & Tryland, 2008), mais des études ont montré que les GLUC des bactéries non-cibles étaient moins induites dans l'environnement que celle d'*E. coli*, et les concentrations en sont généralement négligeables. En revanche, toutes les β -D-glucuronidases exprimées sont stables à 44°C donc réaliser les mesures à cette température ne permet pas d'annihiler les interférences (Tryland & Fiksdal, 1998). Ces essais peuvent cependant être employés comme systèmes d'avertissement précoce pour des contaminations fécales d'eaux récréatives (Tryland & Fiksdal, 1998). Enfin, afin de ne pas avoir à réaliser une isolation avant l'identification des bactéries, des substrats modifiés ont été directement ajoutés à des milieux de culture.

Comme le soulignent Togo et al. (2006) dans leur article, l'intégration de substrats fluorogènes ou chromogènes dans des géloses a permis de diminuer le temps nécessaire pour l'obtention de résultats positifs de 96h à 24h, puisque les colonies positives sont colorées ou fluorescentes et qu'une étape de confirmation n'est plus nécessaire. Par ailleurs, ces essais de culture sont assez simples et sensibles mais pas encore assez rapides pour assurer la protection des usagers (George et al., 2000). Des substrats modifiés ont aussi été combinés à des milieux de culture liquides. En 1982, Feng et Hartman proposent pour la première fois d'intégrer le substrat MUGlu dans le milieu de culture lauryl tryptose pour analyser des échantillons d'eau par fermentation en tubes multiples (Feng & Hartman, 1982). Les tubes caractérisés par la formation de gaz et par la production de fluorescence blanche-bleue sous lampe UV étaient considérés positifs pour *E. coli*. Six ans plus tard, Edberg et Edberg (1988) ont intégré le substrat MUGlu spécifique à l'enzyme β -D-glucuronidase et le substrat ONPG (orthonitrophényl- β -galactosidase) spécifique à l'enzyme β -galactosidase, elle-même spécifique des coliformes, dans un milieu de culture liquide pour créer un test de présence-absence de ces microorganismes dans l'eau. Ainsi, chaque tube devenu jaune au bout de 24h était positif pour les coliformes tandis qu'un tube jaune et fluorescent sous UV était positif à *E. coli*. Les premiers essais de 1988 ont montré que la sensibilité de cette méthode était de

1 UFC/100mL, soit la même que les méthodes de culture standards, avec une meilleure spécificité, et tout en étant capable de détecter des bactéries stressées (Edberg & Edberg, 1988). Cet article a posé les bases de la méthode Colilert développée par la société IDEXX, utilisée en routine à travers le monde et approuvée par de nombreux organismes comme l'U.S. EPA ou l'Organisation Internationale de Standardisation (ISO) (IDEXX, 2017). Cet organisme souligne d'ailleurs le fait que cette méthode ne détecte pas les souches d'*E. coli* entérohémorragiques puisque ces dernières n'expriment pas l'enzyme GLUC (ISO, 2012). La technologie Colilert Quanti-Tray/2000 est détaillée dans la partie Matériel et Méthodes en 4.2.1.

L'utilisation de substrats modifiés a montré de nombreuses qualités lorsqu'elle est associée à la culture, mais les délais d'analyse restent trop longs pour une surveillance en temps réel. C'est pourquoi depuis quelques années plusieurs compagnies ont eu l'idée d'intégrer ces substrats à des machines permettant de se passer de l'étape de culture afin d'avoir des résultats en moins de quelques heures. Plusieurs de ces technologies actuellement sur le marché sont présentées dans la partie suivante.

2.3.4 Comparaison des technologies de suivi sur site

En 2017, l'UNICEF a publié plusieurs profils de produits cibles pour la détection rapide d'*E. coli* dans l'eau (UNICEF, 2017). Dans ces profils, l'organisme y souligne le fait que les méthodes actuellement employées sur le terrain ont des périodes d'incubation trop longues, des procédés nécessitant du personnel formé et expérimenté et impliquant un grand risque d'erreur et donc de faux résultats. L'UNICEF a donc publié le cahier des charges de la technologie idéale pour leurs travaux de terrain. Les exigences étaient que la technologie permette la détection de contamination fécale dans l'eau potable, tout en étant opérationnelle sur le terrain sous des conditions climatiques assez extrêmes (des températures allant de 0 à 45°C, sous une humidité entre 40 et 88%, des changements de température journaliers allant de 25 à 40°C). Par ailleurs, l'appareil, les réactifs et les sous-produits impliqués ne doivent être ni dangereux, ni toxiques, et aucune chaîne du froid ne doit être requise. Parmi les autres points importants, on retrouve la possibilité d'application sur des échantillons d'eau avec de grands écarts de pH ou de turbidité, la simplicité d'utilisation, sans étapes de stérilisation ou d'incubation nécessaires. Plusieurs technologies répondant plus ou moins à ces critères ont été développées. Cinq d'entre elles sont présentées dans le

Tableau 2.4. On remarque ainsi que ces technologies expriment leurs mesures dans des unités différentes. Certaines fournissent des données en unités de réaction enzymatique, comme le ColiMinder® pour lequel les résultats sont en Unités de Fishman Modifiées (UFM)⁴ par 100mL d'échantillon, tandis que d'autres ont des courbes de calibration intégrées qui leur permettent d'exprimer leurs mesures en Unités Formant Colonies (UFC/100mL). Elles n'ont par ailleurs pas toutes les mêmes cibles. Ainsi, les appareils intégrant une étape de culture ne peuvent mesurer que les bactéries cultivables, tandis que ceux basés sur la mesure optique de la quantité d'enzyme détectent toutes les bactéries encore métaboliquement actives et les enzymes libres en solution, généralement liées à des cellules mortes. La technologie LiquID est quant à elle un peu à part, puisqu'elle mesure le tryptophane, considéré comme l'acide aminé le plus présent dans les bactéries *E. coli*. Néanmoins, il est aussi présent dans les protéines d'autres organismes. Même si d'autres mesures optiques (adsorption dans l'UV et dispersion) permettent de mieux cibler la mesure sur les *E. coli* vivantes et capables de former des colonies, le signal n'est pas spécifique (ZAPS Technologies, 2014).

Le premier analyseur automatisé développé pour la détection et la quantification des coliformes totaux à partir d'une méthode enzymatique est la technologie Colifast® (Colifast, 2019; Rompré et al., 2002). L'échantillon y est incubé à 37°C pour les coliformes totaux et 44°C pour *E. coli*. La détection d'un coliforme cultivable prenait ainsi 1 h mais la durée de l'analyse diminuait pour des échantillons plus contaminés (Rompré et al., 2002). Ce système nécessitant une étape de culture il était donc incapable de détecter des coliformes VBNC.

Comme on peut le constater dans le tableau 2.4, la plupart des technologies récemment développées peuvent être connectées à internet et ainsi fournir les résultats en temps réel aux utilisateurs et envoyer des alertes en cas de contamination avérée. Toutes les technologies présentent cependant des durées d'analyse très différentes, allant de 2 minutes pour le LiquID jusqu'à 18h pour le TECTA™ B16, ce dernier comprenant une étape de culture. Il ne détecte donc que les bactéries cultivables tandis que d'autres technologies comme le ColiMinder® visent toutes les bactéries cibles, qu'elles soient cultivables, VBNC ou mortes, ainsi que les enzymes libres (Burnet et al.,

⁴ 1 UFM de glucuronidase d'*E. coli* produit exactement 1,0 µg de phénolphtaléine à partir de phenolphtalein-glucuronide par heure à un pH de 6,8 et une température de 37°C (Sigma-Aldrich, 1998)

2019). En outre, les limites de quantification sont aussi variables : 0,8 mUFM/100mL pour le ColiMinder® contre 1 UFC/100mL pour le TECTA™ B16. La plupart de ces technologies utilisent de surcroît des paramètres de contrôle internes afin de pouvoir vérifier la véracité des mesures. C'est le cas du ColiMinder® et du BACTcontrol. Les technologies TECTA™ B16 et ColiMinder® sont présentées plus en détail dans le Chapitre 4.

Tableau 2.4: Tableau comparatif des technologies ColiMinder®, Tecta™ B16, LiqID, BACTcontrol et Fluidion

Technologie	Principe	Temps de mesure, Fréquence	Connexion internet	Autres caractéristiques
ColiMinder® (VWM, 2017)	<p>Mesure l'activité d'une enzyme spécifique au microorganisme cible, courbe de calibration interne, donne les résultats en mUFM/100mL</p> <p>Entièrement automatisé</p> <p>Appareil approprié pour des suivis au long terme</p>	<p>Environ 30min avec cycle de nettoyage, 15 minutes pour prélèvement et mesure.</p> <p>Mode continu = jusqu'à 54 mesures/jour</p> <p>Échantillon de 6,5 mL</p>	OUI (alertes envoyées si problème, contrôle de l'appareil à distance)	<p>Données récupérées par USB ou sur serveur</p> <p>Peut être connecté à un échantillonneur automatique ISCO</p> <p>De 0 à 40°C</p> <p>25kg</p> <p>Système breveté intégré pour pallier les effets de la turbidité</p> <p>Peut mesurer <i>E. coli</i>, entérocoques ou les bactéries totales, eau douce ou salée</p> <p>Alimentation électrique nécessaire</p>

Tableau 2.4: Tableau comparatif des technologies ColiMinder®, Tecta™ B16, LiqID, BACTcontrol et Fluidion (suite)

<p>TECTA™ B16</p> <p>(Pathogen Detection Systems, 2017)</p>	<p>Entièrement automatisé (sauf le prélèvement de l'échantillon)</p> <p>Mesure la fluorescence émise par les substrats une fois clivés grâce aux enzymes et convertit les résultats en UFC/100mL, limite détection de 1 UFC/100mL pour <i>E. coli</i> et coliformes totaux</p> <p>Capteur de fluorescence multi-longueurs d'ondes couplé à une fibre optique</p>	<p>Résultats en 2 à 18h selon le niveau de contamination</p> <p>Possibilité d'analyser 16 échantillons à chaque fois (16 chambres de mesure dans l'appareil)</p>	<p>OUI</p> <p>Notifications envoyées sur cellulaire, ordinateur ou tablette dès que les résultats sont connus</p>	<p>Test pour <i>E. coli</i> et coliformes totaux simultanément</p> <p>Nécessité de calibrer les chambres de mesure avant analyse</p> <p>Technologie approuvée par de nombreuses institutions nationales</p> <p>Destiné principalement aux systèmes de distribution d'eau potable</p> <p>Alimentation électrique nécessaire</p>
<p>BACTcontrol, anciennement Coliguard (microLAN)</p> <p>(Ryzinska-Paier et al., 2014)</p> <p>(Stadler et al., 2016)</p>	<p>Système d'alerte précoce</p> <p>Mesure par fluorescence l'activité enzymatique de β-D-glucuronidase pour <i>E. coli</i>, β-galactosidase pour les coliformes et la phosphatase alcaline pour la biomasse totale.</p> <p>Résultats en $\text{pmol}_{\text{methylumbelliferyl}}/(\text{min} \cdot 100\text{mL})$</p> <p>Méthode des moindres carrés</p>	<p>1 à 2h pour chaque mesure, donc 24 à 12 analyses possibles par jour selon le constructeur</p>	<p>Non précisé</p>	<p><i>E. coli</i>, coliformes totaux et biomasse totale</p> <p>15 - 30°C</p> <p>25kg</p> <p>Alimentation électrique nécessaire</p>

Tableau 2.4: Tableau comparatif des technologies ColiMinder®, Tecta™ B16, LiqID, BACTcontrol et Fluidion (suite)

Système ALERT, fluidion (fluidion, 2016)	Prélèvement et analyses automatiques in-situ d'un échantillon d'eau Absorbance multispectrale et mesure de la fluorescence Résultats en UFC/100mL	1 à 12h 7 mesures par charge de batterie	OUI Transmission des résultats en temps réel, envoi d'alertes Contrôlable à distance via le site web ou le téléphone cellulaire	<i>E. coli</i> et coliformes totaux Fonctionne dans tous les environnements, sous toutes conditions météorologiques. Pas d'alimentation externe nécessaire Autonomie de 2 semaines à 2 ans selon le mode choisi 0 à 40°C 7kg
Liquid Station (ZAPS Technologies, 2018) (ZAPS Technologies, 2014)	<i>E. coli</i> de 0,1 à $2,3 \cdot 10^7$ MPN/100mL avec une précision de plus ou moins 10% Automatisé, en continu Quantification du tryptophane par mesure de fluorescence à 380nm, absorbance dans l'UV et dispersion puis conversion en MPN d' <i>E. coli</i> Déterminations fortement axées sur les cellules cultivables d' <i>E. coli</i> mais non spécifiques.	Chaque 2 minutes soit 720 fois par jour	OUI Peut configurer les alertes et contrôler l'appareil à distance via l'interface utilisateur sur internet	Appareils de mesure optique brevetés Pas de réactif Mesure de nombreux paramètres de qualité de l'eau, <i>E. coli</i> est le seul organisme détecté Applicable sur des matrices d'eau allant des eaux usées aux eaux ultrapures en passant par les eaux souterraines et de surface. Alimentation électrique nécessaire

CHAPITRE 3 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

Au regard des informations et connaissances actuelles présentées dans le Chapitre 2, il apparaît que plusieurs lacunes restent à combler. L'objectif principal de ce projet consiste à comparer les résultats obtenus avec une méthode enzymatique automatisée (dans notre cas le ColiMinder®) à ceux de méthodes de culture standards sur différents échantillons d'eaux de surface provenant de sites québécois et néo-zélandais afin de mieux comprendre le signal enzymatique mesuré.

Cet objectif global peut alors être subdivisé en objectifs spécifiques tels que :

1. Comparer la répétabilité des méthodes ColiMinder®, Colilert, TECTA™ B16, et filtration sur membranes,
2. Étudier l'impact du signal mesuré en phase soluble sur le signal enzymatique total, et sur les relations entre GLUC et *E. coli*,
3. Comparer les corrélations entre GLUC et *E. coli* sur les différents sites à l'étude, ainsi qu'entre les ratios GLUC/*E. coli* et les concentrations en *E. coli* mesurées par culture,
4. Comparer les décisions de gestion de plage des méthodes standards et du ColiMinder® par définition de seuils limites pour des eaux récréatives,
5. Observer les évolutions temporelles des quantités d'enzymes et de bactéries lors d'un évènement de pluie avec surverse d'égout.

Ce projet de recherche est original puisqu'il permet, d'une part de comparer une nouvelle méthode enzymatique automatisée à des méthodes de culture, en définissant des seuils d'activité enzymatique équivalents aux seuils de culture trouvés dans les réglementations, et en considérant le délai de 24h relatif aux méthodes standards ainsi que le facteur chance, cela n'ayant à notre connaissance pas encore été fait. D'autre part, il s'agit de la première étude comparant les signaux enzymatiques mesurés dans la rivière Waikato de Nouvelle-Zélande à ceux mesurés dans le fleuve Saint-Laurent au Québec.

Les hypothèses de recherche posées sont :

H1 : La définition d'une valeur maximale acceptable pour le signal enzymatique, semblable aux seuils définis pour les méthodes de culture dans les règlements pour les eaux récréatives, permet une comparaison plus représentative de ces méthodes qu'une régression linéaire.

Réfutabilité : L'hypothèse sera réfutée en cas de corrélations et conclusions similaires entre les méthodes, par analyse de seuils et par régression linéaire.

H2 : L'environnement, la matrice d'eau, ainsi que les caractéristiques des sources de contamination impactent le signal enzymatique mesuré et sa relation avec les concentrations en *E. coli*. Par exemple, une contamination âgée engendre une moins bonne corrélation entre GLUC et *E. coli* qu'une contamination fraîche.

Réfutabilité : Si aucune différence notable n'est notée entre les corrélations entre les méthodes pour les sites québécois et néo-zélandais, et pour les différentes sources de contamination fécales répertoriées, alors l'hypothèse sera réfutée.

CHAPITRE 4 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les différents appareils et méthodologies employés lors de ce projet de maîtrise recherche sont présentés dans ce chapitre. Dans un premier temps, une présentation est faite des différents déploiements réalisés, les caractéristiques des sites ainsi que le matériel déployé étant décrits. Les méthodes normalisées appliquées lors des différentes expériences font l'objet d'une seconde partie. La technologie ColiMinder® employée lors de ce projet est présentée dans une troisième partie ainsi que la méthodologie employée pour les expériences sur la phase soluble des échantillons analysés. Enfin, la dernière partie de ce chapitre est consacrée aux stratégies d'analyse des données recueillies au cours des différents déploiements. Un schéma de la démarche scientifique est présenté en Annexe A.

4.1 Sites étudiés

Afin de préparer au mieux un déploiement sur un site, il est primordial d'en connaître les différentes caractéristiques. Dans le cas d'un suivi de qualité bactériologique d'eaux de surface, la connaissance des utilisations qui sont faites des terres entourant la source d'eau peut par exemple permettre d'estimer le niveau de contamination attendu et ses plausibles variations temporelles. Les spécificités de quatre déploiements réalisés au Québec ainsi que celui accompli en Nouvelle-Zélande sont présentées en détail dans les sous-parties suivantes. Tous les déploiements ont pu être réalisés grâce à la participation de nos différents partenaires municipaux au Québec, et à l'équipe du Dr Rebecca Stott au National Institute of Water and Atmospheric Research (NIWA) à Hamilton pour le déploiement sur la rivière Waikato. Ce sont donc ces partenariats qui ont permis de choisir les sites étudiés.

Il est à noter que plusieurs sites québécois ont été étudiés tandis qu'un unique site néo-zélandais a fait l'objet d'un déploiement, tous pour des durées d'études différentes. Ces différences sont dues aux limitations logistiques et techniques des différentes équipes impliquées. En effet, chaque déploiement implique une logistique particulière et requiert l'implication de nombreuses personnes. Ces contraintes techniques et humaines ont ainsi défini les périodes d'étude des différents sites. La carte en figure 4.1 donne une représentation schématique des différents sites étudiés.

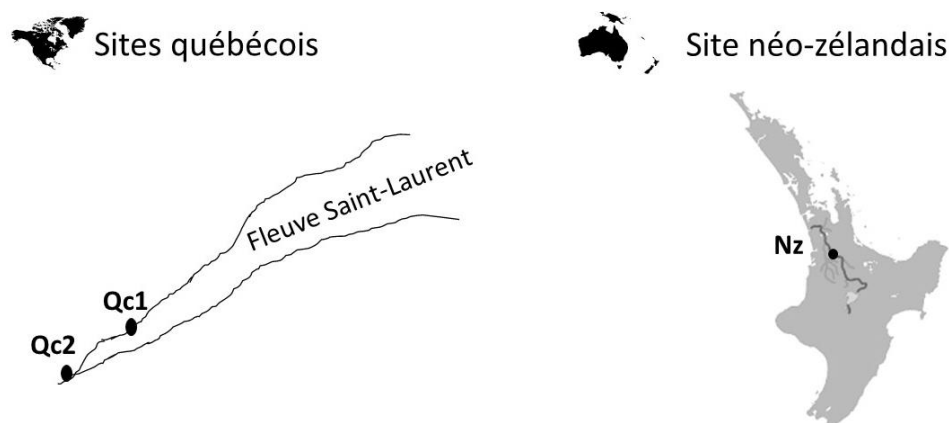


Figure 4.1: Situation géographique des sites étudiés

4.1.1 Site québécois 1

La première localisation (notée Qc1 par la suite) à avoir fait l'objet d'un déploiement est une plage dans la région de Québec en bord du fleuve St Laurent, dont le débit moyen varie entre 7 000 et 15 000 m³/s. Le fleuve St Laurent, long de près de 1200km, prend sa source dans le lac Ontario et se jette dans l'océan Atlantique au niveau du Golfe du St Laurent. Il a toujours eu un rôle primordial dans le commerce canadien et est encore aujourd'hui la voie navigable commerciale la plus importante au Canada (Marsh, 2015). Il alimente également plusieurs barrages hydroélectriques, et représente un environnement avec une flore et une faune unique, comme des bélugas ou des oiseaux migrateurs. Les principales sources de contamination fécales sur ce site sont des surverses ponctuelles, et l'apport de contaminants par des goélands et mouettes, et par les activités agricoles de la région. Ce site présente la particularité d'être soumis à une marée qui inverse le sens du courant deux fois par jour (Garneau & Vanrolleghem, 2017). L'étude a été menée du 18 juin 2016 au 6 septembre 2016, soit sur une durée de 2 mois et demi représentant globalement la saison de baignade. Durant cette période, 2 échantillons composites constitués de 5 points chacun et 2 échantillons ponctuels ont été prélevés quotidiennement toujours aux mêmes emplacements du site. Une fois les échantillons prélevés, ces derniers étaient analysés dans les 24h par ColiMinder® et par filtration sur membrane puis culture sur le milieu mFC BCIG, tel que recommandé par le Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les Changements Climatiques (MDDELCC) dans la méthode MA. 700-Ec. BCIG 1.0 (CEAEQ, 2016). La température des échantillons au moment des analyses fut également relevée. Certaines des données fournies ont dû être écartées car les délais entre l'échantillonnage et l'analyse par le ColiMinder®

étaient supérieurs à 24h. Finalement, 42 points ont été retenus pour les échantillons composites, 38 pour le premier échantillon ponctuel et 39 pour le second échantillon ponctuel.

4.1.2 Site québécois 2

Le second site québécois (noté Qc2 dans le reste du mémoire) étudié est une future plage en bord de St Laurent de la région de Montréal, située au sud-est de l'île. Le déploiement a eu lieu du 25 juillet 2018 au 13 septembre 2018. Ce site est susceptible d'être impacté par des trop-pleins d'égouts répertoriés par la ville, dont un important situé à moins d'un kilomètre du site. La prise d'eau pour les mesures était située dans le fleuve, à 12 mètres de la rive, grâce à une pompe submersible.

Sur place se trouvaient un ColiMinder® et un échantillonneur automatique ISCO (Teledyne ISCO, États-Unis), ce dernier permettant de prélever des échantillons horaires en cas de fortes pluies et/ou surverses d'égouts (cf. Figure 4.2). Pendant des événements de pluie pouvant mener à des surverses, le ColiMinder® et l'échantillonneur automatique étaient réglés à l'horaire. Le reste du temps, le ColiMinder® effectuait des mesures chaque 2h tandis qu'un échantillon était prélevé chaque matin et chaque soir pour être analysé par filtration sur membrane et culture sur milieu mFC BCIG.



Figure 4.2: ColiMinder® installé sur le site Qc2 durant l'été 2018.

4.1.3 Sites dans la Grande région de Montréal

Pour étudier la répétabilité des différentes méthodes employées lors du projet, deux échantillons provenant de deux sites de la grande région de Montréal ont été étudiés. L'échantillon A a été prélevé à l'entrée d'eau brute d'une usine de potabilisation de l'eau desservant le sud-ouest de l'île. La source de l'usine se retrouve dans le lac Saint Louis, et la prise d'eau est proche de la rive. Un prélèvement de 10L a eu lieu le 28 juin 2018.

L'échantillon B, constitué de 10L prélevés le 20 juin 2018, provient lui d'un autre site sur le Saint Laurent, à l'est de l'île. Le site en question est notamment menacé par une surverse d'égout répertoriée par la ville.

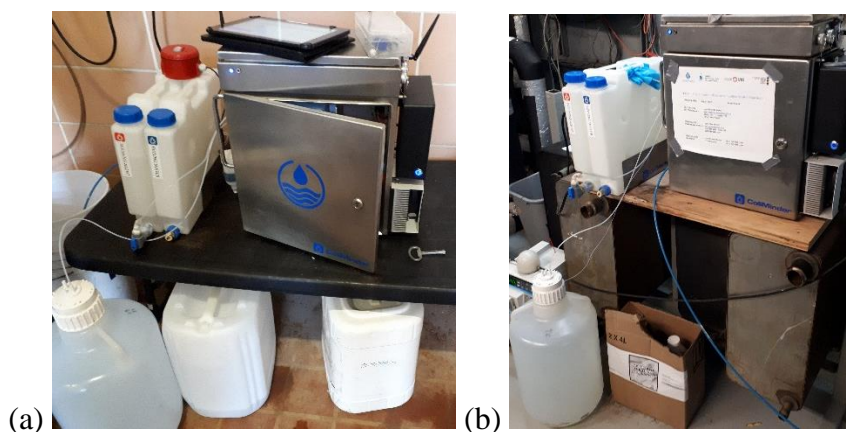


Figure 4.3: Sites d'échantillonnage A (a) et B (b)

4.1.4 Rivière Waikato, Nouvelle-Zélande

Le dernier site étudié dans le cadre de ce projet de maîtrise est la rivière Waikato, qui est la plus longue rivière de Nouvelle-Zélande, s'étendant sur près de 425 km, et dont le débit moyen varie entre 150 et 450 m³/s. Elle est notamment utilisée par les néo-zélandais pour la production d'électricité, avec 8 barrages et 9 stations hydroélectriques répartis sur toute sa longueur. Cela permet la production de 4000 GWh/an soit à peu près 13% de la capacité de production totale de Nouvelle-Zélande. La rivière Waikato est bien entendu aussi un espace de prédilection pour de nombreuses activités nautiques comme la baignade, le waka (un canoé maori) ou encore le bateau de plaisance. Enfin, cette rivière a également une grande importance dans la culture maorie.

La portion de la rivière étudiée ici se trouve dans la ville de Hamilton, quatrième ville la plus peuplée de Nouvelle-Zélande, située dans le centre de l'île Nord. La qualité de l'eau y est

principalement influencée par l'environnement urbain, l'agriculture qui est très présente dans la région Waikato et le barrage de la station Karapiro Hydro Power Station situé environ 35km en amont. Les principales sources de contamination fécale de cette rivière sont ainsi issues de l'agriculture (accès direct à la rivière pour le bétail, épandage...), des effluents des fermes et des animaux sauvages (Ritchie & Donnison, 2010). Enfin, l'eau de la rivière est également utilisée pour approvisionner en eau potable les habitants de la région, après un traitement à 8 étapes : double dégrillage, floculation et sédimentation, filtration sur sable, filtration sur charbon actif, désinfection aux UV, au chlore et aux ions fluorure, et enfin la correction du pH avant l'envoi dans le réseau (Hamilton City Council, 2010).



Figure 4.4: Photos de la rivière Waikato (a) et du site d'étude (b)

Le matériel était installé dans une cabane sur la rive de la rivière Waikato, située sur le terrain de l'association ATC qui vient en aide à des jeunes de la région, dans la ville de Hamilton. Les principales sources de contamination fécales étaient diffuses (bétail, ruissellements, épandage) ou dues à des animaux sauvages ou domestiques. Un système de rejet d'eaux pluviales se trouvait également juste en amont du site. La prise d'eau était proche de la rive, afin de pouvoir plus facilement prélever l'eau et nettoyer le tuyau d'entrée de la pompe notamment. Le déploiement a eu lieu du 20 décembre 2017 au 13 avril 2018, mais je n'étais présente sur place que du 26 février au 27 avril 2018.

De nombreux appareils y étaient installés : un ColiMinder®, une sonde EXO2 (EXO, États-Unis) mesurant entre autres toutes les 15 minutes la turbidité, l'oxygène dissous et la chlorophylle, un s::can spectro::lyser (s::can Messtechnik GmbH, Autriche) mesurant la turbidité toutes les 2

minutes, et un TriOs (TriOs Mess-und Datentechnik GmbH, Allemagne) mesurant les nitrates. Des mesures de turbidité ont également été effectuées au laboratoire du NIWA (National Institute of Water and Atmospheric research), avec un turbidimètre HACH 2100AN (Hach, États-Unis), pour les échantillons prélevés. Enfin, un échantillonneur automatique ISCO Avalanche (Teledyne ISCO, États-Unis) se trouvait sur le site pour prélever des échantillons à analyser avec les méthodes standards au laboratoire.

Le ColiMinder® était en mode horaire lors des pluies, et mesurait toutes les 1h30 ou 2h le reste du temps, sauf en cas de problème avec l'appareil nécessitant une intervention de l'équipe pour reprendre les mesures.

4.2 Méthodes standards de quantification d'*Escherichia coli*.

4.2.1 Colilert

La méthode Colilert (IDEXX, États-Unis), combinée à la technologie Quanti-Tray/2000, utilisée lors de ce projet a été développée par la société IDEXX. Il s'agit d'une méthode approuvée par l'U.S. EPA et également répertoriée dans les Standard Methods for Examination of Water and Wastewater ("9223 Enzyme substrate coliform test," 2017). Elle est basée sur l'ajout de substrats modifiés dans un milieu de culture liquide. Le protocole fourni par le fabricant a été suivi (IDEXX, 2017). Une dose de réactifs était ainsi ajoutée à 100mL d'échantillon dilué ou non. Une fois les réactifs dissouts, le mélange était versé dans un Quanti-Tray avant que celui-ci ne soit scellé puis incubé à $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ pendant 24h.

Durant le projet, il n'y a généralement pas eu besoin de faire de dilution pour les échantillons analysés. Des dilutions ont seulement été nécessaires pendant les évènements de pluie en Nouvelle-Zélande. Dans ce cas, 10mL d'échantillon était utilisés au lieu de 100mL.

4.2.2 Filtration sur membrane

Au cours de l'étude, différents milieux de culture ont été utilisés. Néanmoins, les manipulations réalisées furent toujours les mêmes. La station de filtration, préalablement stérilisée (par autoclave à Polytechnique Montréal ou par ébullition au NIWA) était rincée à l'eau milliQ (échantillons de Nouvelle-Zélande) ou avec de la solution de tampon phosphate (échantillons analysés au laboratoire de Polytechnique Montréal). Après homogénéisation de l'échantillon à analyser, un

certain volume était filtré sur une membrane de 47mm de diamètre et d'une porosité de 0,45 μ m, stérile et quadrillée, en esters de cellulose mélangés (Millipore, Allemagne). Si le volume était inférieur à 20mL, alors de l'eau milliQ ou de la solution tampon était ajoutée pour permettre une bonne répartition de l'échantillon sur le filtre. Un double rinçage de la station de filtration était ensuite effectué afin de s'assurer d'avoir filtré tout le volume d'échantillon voulu. Le filtre était ensuite déposé sur la gélose coulée dans une boîte de Petri. Après incubation des géloses, le décompte des colonies correspondant à *E. coli* était effectué. Les caractéristiques des différents milieux de culture utilisés sont rassemblées dans le Tableau 4.1.

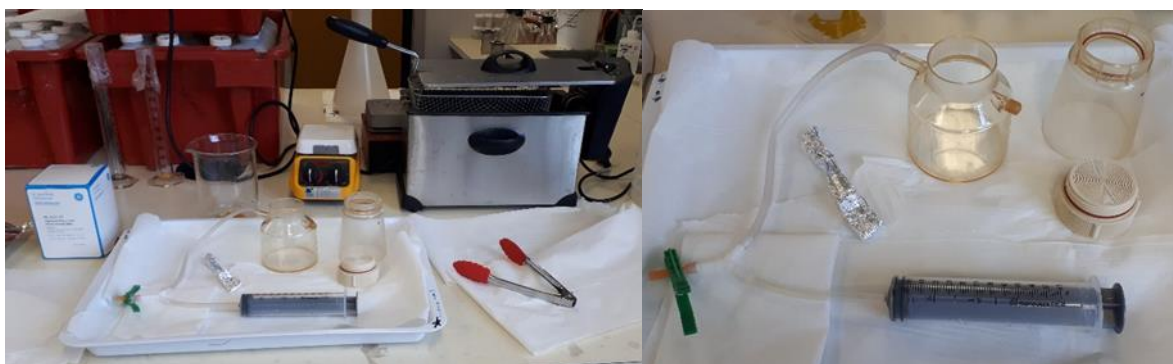
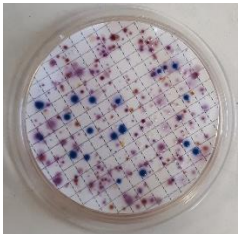
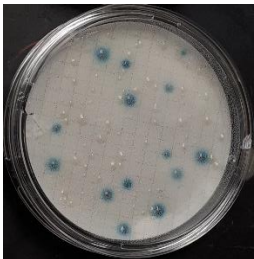


Figure 4.5: Matériel de filtration sur membrane, Nouvelle-Zélande

Tableau 4.1: Comparaison des trois géloses utilisées pour la culture d'*E. coli*

Gélose	Provenance des échantillons	Incubation (température et durée)	Détection <i>E. coli</i>	Principe(s) de sélectivité d' <i>E. coli</i>	Exemple de gélose	Référence
Brilliance	Nouvelle-Zélande	37°C - 24h	Colonies bleu foncé / violet	β -D-glucuronidase, sodium lauryl sulphate (contre les bactéries Gram +)		(Thermo Scientific, 2019)
MI agar	Canada	35°C - 24h	Colonies bleues	Antibiotique, β -D-glucuronidase		(U.S. Environmental Protection Agency, 2002)
mFC BCIG	Canada	44,5 °C (+/- 0,2°C) - 24h (+/- 2h)	Colonies bleues	Température, sels biliaries (contre les bactéries Gram+), β -D-glucuronidase		(CEAEQ, 2016)

4.2.3 TECTA™ B16

Il s'agit de la première technologie de détection et quantification d'*E. coli* et des coliformes totaux totalement automatisée et installable sur le terrain développée par la société canadienne TECTA-PDS. Elle a été créée afin de répondre aux besoins de surveillance de la qualité microbiologique de l'eau dans les systèmes de distribution d'eau potable, son utilisation est en théorie très simple. Il suffit de remplir une cartouche de réactifs prête à l'emploi avec 100mL d'échantillon, sans dilution. La cartouche pleine et bien scellée est ensuite insérée dans une des chambres de mesure de l'appareil. Les détection et quantification des coliformes totaux et d'*E. coli* sont basées sur une méthode enzymatique quelque peu similaire à celle du Colilert (IDEXX, États-Unis). Ici, après multiplication des bactéries, les enzymes β -D-glucuronidase et β -galactosidase sont exprimées, et les fluorochromes contenus dans les substrats sont libérés après clivage de ces derniers par l'action des enzymes citées précédemment. Une mesure optique de la fluorescence émise est alors faite, puis le logiciel de l'appareil convertit ces données en UFC/100mL. Cette technologie ne mesure donc que les *E. coli* cultivables (Burnet et al., 2019).

Une fois l'analyse de l'échantillon lancée, le résultat est obtenu après 2 à 18h, selon le niveau de contamination de l'échantillon en question. Les résultats peuvent être envoyés directement sur un téléphone, une tablette ou un ordinateur, facilitant une prise de décision rapide en cas de détection d'*E. coli*.



Figure 4.6: Photos du TECTA™ B16 (a) et de son écran une fois les analyses terminées (b)

Cette technologie possède les autorisations réglementaires de l'U.S. EPA, de The Association of Analytical Communities (AOAC), du Ministère de l'Environnement de l'Ontario, du National Institute of Environmental Research (NIER) de Corée du Sud, du Department of Health – National Reference Laboratory des Philippines et du Ministère de la Santé de Nouvelle-Zélande. Sa validation a été faite avec les tierces parties suivantes : l'U.S. EPA Environmental Technology Verification Program, le Journal of Microbiological Methods, Monash University Melbourne Water EPA Victoria Australia, le Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les Changements Climatiques du Québec (MDDELCC), et la Société des Établissements de Plein Air du Québec (SEPAQ).

4.3 Méthode enzymatique automatisée : ColiMinder®

L'ensemble de ce projet de maîtrise repose sur l'utilisation et l'étude d'une technologie récente de détection et quantification d'*Escherichia coli* par méthode enzymatique, ici le ColiMinder®, développé par la société autrichienne Vienna Water Monitoring Solutions (VWM Solutions, Autriche).

4.3.1 Présentation générale

La détection se fait par méthode enzymatique : il est reconnu que la grande majorité des souches d'*E. coli* sont capables d'exprimer l'enzyme β -D-glucuronidase (voir 2.3.3). Le rôle de cette enzyme est de catalyser la rupture des liaisons osidiques des β -D-glucuronides. C'est cette fonction qui est utilisée dans la méthode de détection étudiée : le substrat adopté est un β -D-glucuronide modifié, comprenant une molécule d'acide glucuronique et un fluorochrome. Ce dernier, une fois séparé de l'acide glucuronique par l'enzyme, fluoresce et c'est cette fluorescence qui peut être mesurée afin d'en quantifier la concentration dans l'échantillon.

Pour chaque mesure, un échantillon de 6,5mL est prélevé et 0,5mL de solution tampon ainsi que 50 μ L de substrat y sont ensuite ajoutés. La température d'incubation est fixée à $44 \pm 0,1^\circ\text{C}$ dans la chambre de mesure, afin de maximiser la fluorescence émise après l'action de GLUC (George et al., 2000). La mesure ne commence automatiquement qu'une fois la température stabilisée (Koschelnik et al., 2015). L'appareil renvoie ainsi des mesures en Unités de Fishman modifiées (UFM) par 100mL, correspondant à une activité enzymatique spécifique par unité de volume. Cette technologie possède également un système breveté de mesure de fluorescence pour éviter toute

influence de la turbidité de l'échantillon sur la mesure. Une mesure prend environ 30 minutes, le cycle d'autonettoyage de l'appareil compris.

Lors du projet, le ColiMinder® a été utilisé uniquement pour détecter et quantifier les bactéries *E. coli* présentes dans des eaux douces, mais l'appareil peut également être alimenté avec d'autres réactifs afin de détecter les bactéries totales, ou les *Enterococcus*, en eau douce ou eau salée. Cette technologie est aussi étudiée par des équipes autrichiennes et néo-zélandaises, en plus de notre équipe canadienne.

Un schéma des différentes composantes de l'appareil est proposé en Figure 4.7, tandis que des photos de certains des ColiMinder® déployés pour le projet sont présentées en Figure 4.8.

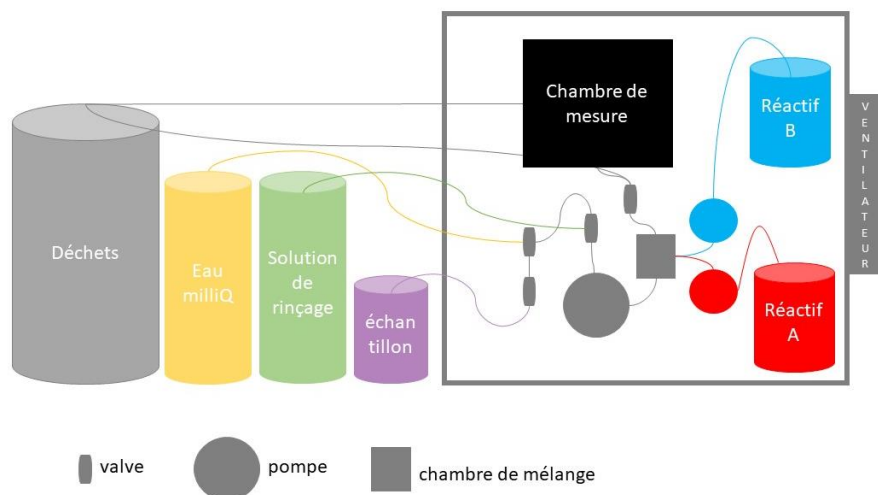


Figure 4.7: Schéma du ColiMinder®



Figure 4.8: Photos de ColiMinder® sur différents sites

4.3.2 Signal en phase soluble

Afin d'en apprendre un peu plus sur l'origine du signal du ColiMinder®, des essais ont été réalisés sur des échantillons préalablement filtrés sur des filtres stériles en esters de cellulose mélangés de 0,22µm de diamètre de pores et 33mm de diamètre (Millipore, Allemagne), afin d'analyser uniquement la phase soluble de l'échantillon. En effet, une telle filtration permet de retirer en quasi-totalité les particules en suspension mais aussi les bactéries *E. coli* puisqu'elles mesurent entre 0,5 et 4 µm. Le signal ainsi mesuré représente donc tous les composés en phase soluble également détectés par la méthode enzymatique, comme des enzymes GLUC libres, ou certains composés pouvant interférer avec le signal enzymatique. La proportion de ce signal au regard du signal global de l'échantillon peut ainsi apporter des informations sur l'âge de la contamination et l'état des bactéries. Un signal en phase soluble plus élevé pourrait par exemple indiquer une faible quantité d'*E. coli* avec des membranes viables, puisqu'une grande quantité d'enzyme se trouverait libre dans l'échantillon.

Pour ce faire, un certain volume d'échantillon brut était prélevé à l'aide d'une seringue sur laquelle était ensuite fixé le filtre, puis l'échantillon était poussé au travers de ce dernier et le filtrat était récupéré et analysé au ColiMinder®. Le pourcentage du signal brut représenté par la phase soluble a ensuite été calculé à l'aide de l'équation 4.1 :

Équation 4.1: Calcul du pourcentage extracellulaire du signal

$$\%_{extracellulaire} = \frac{\text{signal filtré}}{\text{signal brut}} * 100$$

4.4 Traitement des données

De nombreuses données ont été recueillies au cours du projet et ont ensuite dû être analysées. Microsoft Excel 2016 (Microsoft, États-Unis) fut le seul logiciel employé pour le traitement des données, que ce soit pour des calculs statistiques classiques, ou pour des analyses comparatives entre le signal enzymatique et les méthodes standards sur des échantillons d'eaux récréatives.

4.4.1 Calculs de base

Le logiciel Microsoft Excel 2016 (Microsoft, États-Unis) a été utilisé afin, dans un premier temps, de rassembler toutes les données collectées, puis de les traiter avec les fonctions de base : moyenne

arithmétique, moyenne géométrique, calcul des délais entre les différentes analyses, calcul du pourcentage de l'activité enzymatique en phase soluble, calcul du coefficient de variabilité (cf. 4.4.2).

Excel a également été employé afin de tracer les différents graphiques des suivis temporels des différents sites, en signal de base ou lors d'évènements de pluies. Les corrélations entre les différentes mesures ont aussi été estimées avec l'outil graphique, et notamment la fonction de régression linéaire, fournissant l'équation de la droite mais aussi le coefficient de détermination R^2 .

4.4.2 Expérience de répétabilité

Au cours du projet, une expérience permettant de comparer les coefficients de variation de différentes méthodes approuvées par les autorités et celui de la technologie enzymatique automatisée a été menée. Pour ce faire, deux échantillons ont été soumis à la même série de mesures, présentée dans le Tableau 4.2.

Tableau 4.2 : Analyses réalisées pour l'expérience de répétabilité

	Échantillon A	Échantillon B
ColiMinder® brut	10 mesures + 1 blanc	10 mesures + 1 blanc
ColiMinder® filtré	-	7 fois
TECTA™ B16	10 mesures + 1 blanc	10 mesures + 1 blanc
Colilert	10 mesures + 1 blanc	10 mesures + 1 blanc
MI agar	10 mesures + 1 blanc	10 mesures + 1 blanc
mFC BCIG	10 mesures + 1 blanc	10 mesures + 1 blanc
Opérateurs	3	4

Dans le tableau 4.2, un blanc représente une mesure réalisée sur de l'eau tamponnée ou de l'eau milliQ, à savoir de l'eau où aucune *E. coli* n'est présente, afin de s'assurer de l'absence de biais dans les mesures. Les analyses TECTA™, Colilert et les filtrations sur membrane ont été réalisées au laboratoire de Polytechnique Montréal pour les deux échantillons. Les analyses au ColiMinder® ont été réalisées dans ce même laboratoire pour l'échantillon B, et directement sur le site de prélèvement de l'échantillon A pour ce dernier. Pour cela, 250mL de celui-ci avaient été versés

dans une bouteille du même volume préalablement autoclavée. La bouteille a ensuite été placée dans de la glace, sur une plaque d'agitation, pendant toute la durée des 10 mesures (soit environ 5 heures). Le montage ainsi utilisé est présenté en Figure 4.9 :



Figure 4.9: Montage pour la répétabilité du ColiMinder®, échantillon A

Une fois les données récoltées, le coefficient de variation (CV) de chaque méthode a été calculé, ainsi que celui de chaque opérateur pour les méthodes nécessitant une lecture. L'équation 4.2 a pour cela été utilisée :

Équation 4.2: Calcul du coefficient de variation $CV(en\ %) = \frac{\text{écart type}}{\text{moyenne}} * 100$

Pour les analyses avec lecture, le coefficient de variation sur l'ensemble des réplicas a été calculé pour chaque opérateur, et le coefficient de variation moyen de la méthode a été considéré égal à la moyenne de ces coefficients de variation. D'autre part, le coefficient de variation a été estimé pour chaque réplica entre les différents opérateurs, et la moyenne de ces coefficients de variation est nommée variation moyenne entre opérateurs.

4.4.3 Analyses par définition de seuils limites

Plutôt que de comparer l'activité enzymatique aux méthodes standards uniquement à l'aide de régressions linéaires, qui s'avèrent généralement plus que moyennes puisqu'il est maintenant reconnu que les méthodes enzymatiques ne mesurent pas les mêmes entités que les méthodes basées sur la culture (voir 2.3.3), une autre approche a été employée.

Cette méthode consiste à définir un seuil maximal acceptable pour l'activité enzymatique de β -D-glucuronidase équivalent à celui fixé pour les bactéries cultivables (généralement défini dans les

guides et directives nationales des différents pays, voir 2.2). Ce seuil est estimé pour chaque site à partir de toutes les données recueillies lors du déploiement, par temps sec et lors d'événements pluvieux. Une analyse graphique permet dans un premier temps d'estimer l'intervalle dans lequel se trouve le seuil optimal du site, puis une comparaison des décisions de plage permet ensuite son optimisation. Pour un seuil en mUFM/100mL fixé et un même échantillon sont alors comparées les décisions de gestion de plage (ouverture ou fermeture de la plage) basées sur les résultats de l'activité GLUC, de la culture et de la culture sans tenir compte du délai de 24h indissociable de cette technique. Ainsi, sur la ligne de l'échantillon i se trouve le résultat i de l'activité GLUC, le résultat i de la culture (référence, en réalité connu au jour $i+1$) et le résultat $i-1$ de la culture (celui de l'échantillon de la veille, connu 24h après prélèvement). Dans tout le mémoire, les indices représentent le jour de prélèvement de l'échantillon. Cette méthode permet ainsi de comparer la méthode de culture telle qu'employée aujourd'hui (c'est-à-dire avec 24h d'écart entre l'échantillonnage et le résultat), la mesure de l'activité enzymatique (connue quasi-instantanément), et la situation idéale mais non réelle, à savoir le résultat de la culture connu le jour du prélèvement de l'échantillon. Seuls des seuils de bactéries cultivables étant définis dans les réglementations actuelles, il nous a paru plus judicieux de choisir comme référence absolue pour nos comparaisons les décisions prises sur base des résultats des méthodes de culture.

Les comparaisons des décisions de gestion de plage (ouverture ou fermeture de la plage) basées sur les résultats de l'activité GLUC et de la culture avec 24h par rapport à celles basées sur la culture sans délai (la référence choisie) dans des matrices de confusion permettent alors le calcul des pourcentages de faux-positifs et faux-négatifs pour chaque technique. Ici, est considéré comme un faux-positif lorsque la technique recommande la fermeture de la plage alors que la culture sans 24h préconise son ouverture (pas de dépassement du seuil limite de la culture). Inversement, un faux-négatif est lorsque la méthode prône l'ouverture de la plage étudiée alors que la culture sans 24h exige sa fermeture (dépassement du seuil maximal acceptable). Au vu de ces définitions, il est plus important du point de vue de la sécurité des usagers d'avoir de faibles pourcentages de faux-négatifs, c'est pourquoi le critère d'optimisation de la valeur mUFM maximale acceptable a été la minimisation du pourcentage de faux-négatifs, tout en essayant de minimiser par la suite le pourcentage de faux-positifs. Des matrices de confusion rassemblant les différents pourcentages ont ainsi été calculées par itérations manuelles.

Des études ont montré que différentes méthodes analytiques peuvent arriver à la même décision uniquement par chance (Dorevitch, Shrestha, DeFlorio-Barker, Breitenbach, & Heimler, 2017). Pour prendre ce paramètre chance en compte, ainsi que le délai de 24h relatif aux méthodes de culture, une deuxième analyse comparative a été effectuée entre les méthodes de culture et la méthode entièrement automatisée de mesure enzymatique. Pour cette seconde analyse, seules les données issues des suivis en routine (1 échantillon par jour, généralement prélevé le matin) ont été considérées. Les décisions de gestion de plage basées sur les résultats de l'activité GLUC aux jours i et $i-1$ sont ainsi comparés à celles basées sur les résultats du jour $i-1$ de la culture, connus au jour i . Les mêmes définitions de faux-positifs et faux-négatifs ont été appliquées : un faux-négatif étant quand les résultats GLUC recommandent l'ouverture de la plage alors que ceux de la culture intiment sa fermeture, et un faux-positif étant quand l'activité enzymatique préconisent la fermeture de la plage tandis que l'accès à l'eau est permis par les résultats de culture. Les pourcentages d'accord globaux ont été calculés. Afin de prendre en compte le fait que les accords de décisions entre ces méthodes peuvent être dus au hasard, le coefficient kappa de Cohen (noté κ par la suite) a également été calculé pour chaque comparaison, sur chaque site, à partir de la formule fournie en équation 4.3.

Équation 4.3 : Calcul du kappa de Cohen
$$\kappa = \frac{\text{Pr}(a) - \text{Pr}(e)}{1 - \text{Pr}(e)}$$

Avec : $\text{Pr}(a)$ l'accord observé entre les deux méthodes

$\text{Pr}(e)$ la probabilité d'accord par chance entre les deux méthodes

Le kappa est un coefficient, variant entre -1 et 1, qui permet de mesurer l'accord entre deux observateurs (ou méthodes analytiques dans notre cas) tout en considérant le facteur chance. En résumé, un κ inférieur à 0 signifie que les deux méthodes comparées sont en total désaccord, un κ nul représente un accord uniquement basé sur la chance, et un κ égal à 1 illustre un accord parfait entre les deux techniques. Pour les valeurs intermédiaires, plusieurs tables d'interprétation de ce coefficient ont été proposées, et dans cette étude nous nous sommes basés sur celle proposée par McHugh (2012), rappelée dans le Tableau 4.3.

Tableau 4.3: Table d'interprétation du coefficient κ de Cohen, adaptée de McHugh (2012).

Kappa de Cohen	Degré d'accord
0 – 0,20	Aucun
0,21 – 0,39	Minimal
0,40 – 0,59	Faible
0,60 – 0,79	Modéré
0,80 – 0,90	Fort
> 0,90	Presque parfait

CHAPITRE 5 RÉSULTATS

Les résultats présentés dans cette partie ont été obtenus lors d'un déploiement de l'équipe du NIWA de Hamilton entre le 20 décembre 2017 et le 12 avril 2018 sur la rivière Waikato, ainsi que lors de divers déploiements sur différents sites québécois entre 2016 et 2018.

Dans un premier temps, des expériences ont été menées afin d'en apprendre davantage sur la signification du signal fourni par l'appareil, en comparaison avec les méthodes standards. Ces expériences comprennent une étude comparative de la répétabilité de différentes méthodes, enzymatiques et de culture, pour la détection et la quantification de l'indicateur de contamination fécale *E. coli*; une étude de l'impact du signal enzymatique en phase soluble; ainsi que le suivi de l'évolution des ratios GLUC/*E. coli*.

La seconde sous-partie rassemble les résultats relatifs aux déploiements de ColiMinder® sur différents sites de baignade, et la comparaison de la réponse enzymatique avec les mesures par méthodes standards.

Enfin, la dernière section porte sur le suivi de l'activité enzymatique et des concentrations d'*E. coli* lors d'un évènement de pluie sur un site de la Grande région de Montréal.

5.1 Analyse du signal du ColiMinder®

Afin de mieux appréhender la signification du signal enzymatique mesuré, des expériences de répétabilité sur deux échantillons, ainsi que l'étude du signal en phase soluble et de l'évolution des ratios d'enzyme par bactérie ont été réalisées, et leurs résultats respectifs sont présentés dans cette partie.

5.1.1 Expérience de répétabilité

Deux études comparatives des coefficients de variation de différentes méthodes ont été menées lors de l'été 2018, en appliquant la méthode présentée en section 4.4.2 de ce mémoire.

La première expérience portait sur un échantillon relativement peu contaminé (la moyenne des répliques des décomptes de colonies sur les deux géloses étant de 6 UFC/100mL) prélevé le 28 juin 2018 sur le site A de la région de Montréal, et nommé échantillon A. La turbidité de l'échantillon était de 5,63 NTU (moyenne d'un triplicata de mesures de turbidité avec le même appareil (TL2300

turbidimètre à lampe de tungstène, Hach, États-Unis). La seconde étude était sur un échantillon plus contaminé provenant du site B (166 UFC/100mL et 3,0 NTU en moyenne) prélevé et analysé le 20 juin 2018, et nommé échantillon B. Les variabilités calculées à l'aide de l'Équation 4.2 sont rassemblées dans la Figure 5.1.

La variabilité la plus élevée pour l'échantillon A, et pour l'ensemble des expériences, est obtenue avec la mesure d'*E. coli* par TECTA™ (près de 82%), tandis que les méthodes TECTA™ pour coliformes totaux, Colilert et cultures sur les géloses MI agar et mFC BCIG ont des variabilités semblables autour de 36%. Finalement, le ColiMinder® est la méthode présentant le plus faible pourcentage de variation (11%). Plusieurs différences dans les résultats de l'échantillon B peuvent alors être soulignées. Tout d'abord, les méthodes TECTA™ et Colilert présentent toutes deux une variabilité autour de 21% tandis que les géloses MI agar et mFC BCIG ont un coefficient de variation proche de 8%. Néanmoins, le ColiMinder® reste la méthode avec la meilleure répétabilité, même lors de l'analyse de la phase soluble de l'échantillon.

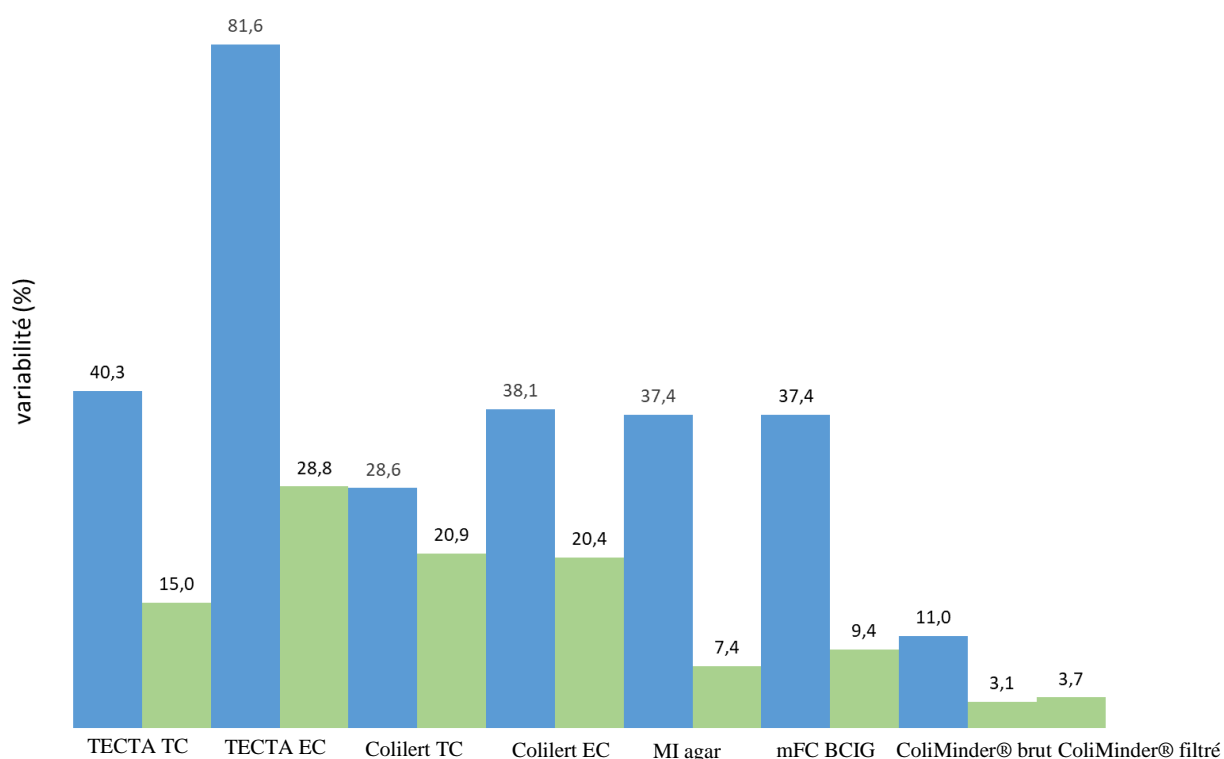


Figure 5.1: Coefficients de variation des différentes techniques de dénombrement pour les échantillons A (bleu) et B (vert). TC : Coliformes Totaux, EC : *E. coli*

Pour l'échantillon A, la répétabilité moyenne entre trois exécutants a été calculée pour les méthodes nécessitant une lecture de la part d'un technicien. Il apparaît que celle-ci est inférieure pour les

deux méthodes de filtration sur membrane et culture sur gélose en comparaison avec celles du Colilert. Les résultats sont réunis dans le Tableau 5.1.

Tableau 5.1: Répétabilité moyenne entre opérateurs, échantillon A

Méthode d'analyse	Répétabilité moyenne entre opérateurs (%)
Colilert TC	6,1
Colilert EC	10,5
mFC BCIG	2,6
MI agar	2,1

Comme pour l'échantillon A, la répétabilité moyenne entre opérateurs a été calculée pour les méthodes de culture et Colilert, entre quatre exécutants. Celles-ci sont présentées dans le Tableau 5.2. Cette fois-ci, le Colilert garde un pourcentage similaire pour les coliformes totaux et les bactéries *E. coli*, aux alentours de 3%, tandis que la gélose mFC BCIG a le pourcentage de variation le plus élevé (proche de 5%) et la gélose MI agar la variabilité la plus faible (2,3%).

Tableau 5.2: Répétabilité moyenne entre opérateurs, échantillon B

Méthode d'analyse	Répétabilité moyenne entre opérateurs (%)
Colilert TC	3,3
Colilert EC	3,5
mFC BCIG	4,7
MI agar	2,3

Il est à noter que les pourcentages de variation de toutes les méthodes étudiées sont plus élevés dans le cas de l'échantillon A. Par ailleurs, la répétabilité moyenne entre opérateurs augmente pour la technologie Colilert dans l'échantillon A alors qu'elle est plus élevée pour les méthodes de culture dans l'échantillon B.

5.1.2 Signal en phase soluble et son impact sur les corrélations entre les méthodes

Un point important généralement soulevé lors du développement de méthodes enzymatiques pour la détection et quantification de microorganismes est que l'enzyme mesurée n'est souvent pas totalement spécifique au microorganisme cible. Ainsi, l'enzyme β -D-glucuronidase n'est présente que dans 87 à 97% des souches d'*E. coli* et est aussi exprimée par d'autres microorganismes que l'on peut retrouver dans des eaux de surface (Rice et al., 1990; Tryland & Fiksdal, 1998). Des substances naturellement présentes dans ces eaux peuvent aussi interférer avec le signal (Togo et al., 2006). De là nous est venue l'idée d'analyser, au ColiMinder® et par culture, la phase soluble de différents échantillons de la rivière Waikato, avec la méthodologie explicitée en partie 4.3.2.

Ainsi, le pourcentage du signal du ColiMinder® dû au signal de la phase soluble variait entre 3,7 et 57,1%. Il représentait en moyenne 22% du signal total. Un seul échantillon présentait un pourcentage considéré nul car le signal mesuré en phase soluble était négatif (égal à -0,1mUFM/100mL). Les corrélations linéaires entre filtration sur membrane puis culture sur Brilliance agar, et ColiMinder® avec ou sans signal mesuré en phase soluble, sont représentées en Figure 5.2. Le coefficient de corrélation est bon et similaire dans les deux cas ($R^2 \sim 0,82$).

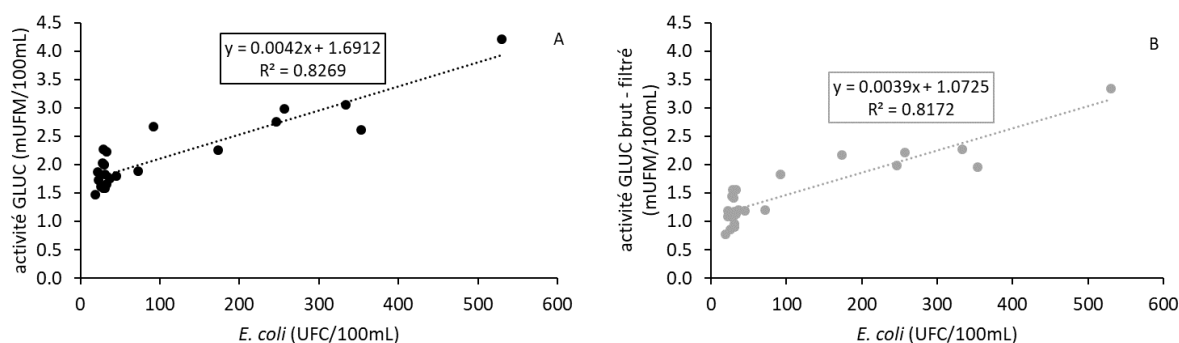


Figure 5.2: Comparaison des corrélations entre filtration sur membrane et signal enzymatique avec (A) et sans signal 0,22 μ m (B), site NZ (n=23 points)

Les corrélations linéaires entre ColiMinder®, avec ou sans le signal mesuré en phase soluble, et Colilert sont illustrées à la Figure 5.3. Une fois encore, les coefficients de corrélation R^2 sont très proches mais cette fois-ci assez faibles (environ 0,32).

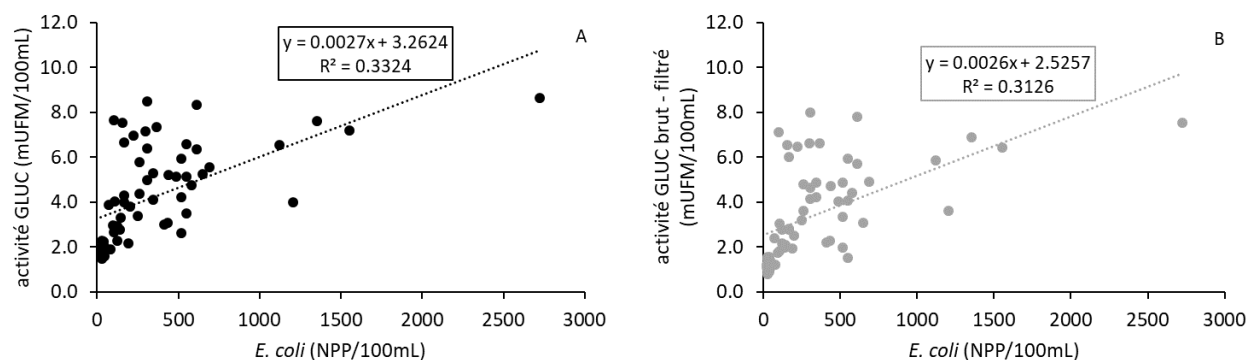


Figure 5.3: Comparaison des corrélations entre Colilert et signal enzymatique avec (A) et sans signal 0,22µm (B), site NZ (n=62 points)

5.1.3 Ratios GLUC/ *E. coli*

Les méthodes standards et la méthode enzymatique intégrée au ColiMinder® ne mesurant pas la même chose, il apparaissait judicieux d'observer l'évolution du ratio de ces deux entités sur les différents sites étudiés au cours de ce projet. La figures 5.4 illustre pour deux sites québécois l'évolution du rapport de l'activité de β -D-glucuronidase (GLUC) et des concentrations en *E. coli* cultivables en fonction de ces dernières.

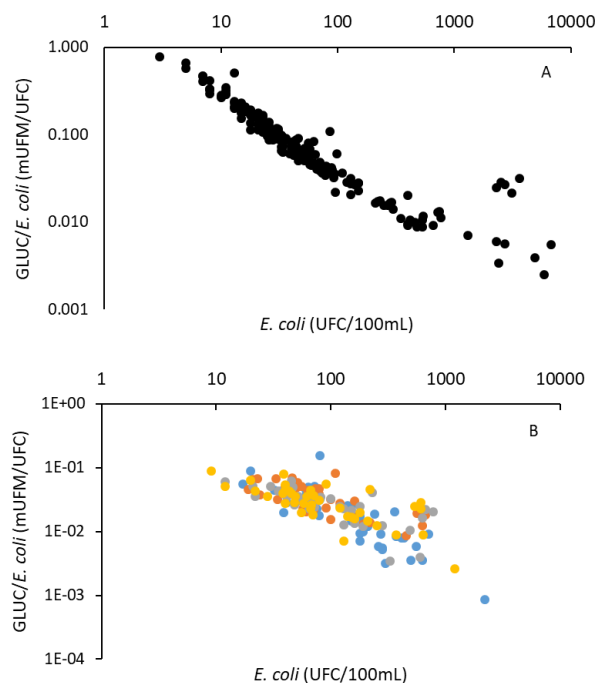


Figure 5.4: Évolutions du ratio GLUC/*E. coli* en fonction des concentrations d'*E. coli* cultivables.

A : site Qc2 : $y = -0,6823x + 0,0175$, $R^2 = 0,86$, B : site Qc1 (bleu = composite 1 : $y = -0,8317x -$

0,0098, $R^2=0,74$, orange = composite 2 : $y = -0,4378x - 0,6702$, $R^2=0,52$, gris = ponctuel 1 : $y = -0,4606x - 0,6906$, $R^2=0,54$, jaune = ponctuel 2 : $y = -0,4539x - 0,6917$, $R^2=0,54$).

Il apparaît que le ratio GLUC/*E. coli* diminue globalement avec des concentrations en *E. coli* croissantes. Cela signifie donc que pour produire une même quantité de β -D-glucuronidase, un nombre plus grand de bactéries est nécessaire en cas de contamination plus importante.

5.2 Application du ColiMinder® aux eaux récréatives

L'une des applications possibles des technologies enzymatiques autonomes est le suivi de la qualité bactériologique d'eaux à usage récréatif. Dans le cadre de ce projet, des suivis en quasi continu ont été réalisés sur deux plages québécoises en bord du fleuve Saint-Laurent, ainsi que sur la portion de la rivière Waikato traversant la ville d'Hamilton, où les habitants ont l'habitude de se baigner et de faire de l'aviron.

5.2.1 Corrélations linéaires

Dans un premier temps, les corrélations linéaires pouvant exister entre les concentrations en *E. coli*, mesurées par culture ou Colilert, et les activités enzymatiques mesurées par le ColiMinder® ont été tracées. Les méthodologies employées lors des différents déploiements sont détaillées dans la partie Matériel et Méthodes au Chapitre 4.

5.2.1.1 Site québécois 1

Une première plage en bord du Saint-Laurent a fait l'objet d'un suivi de deux mois à l'été 2016. Sur ce site, quatre échantillons différents étaient analysés chaque jour, par culture et par ColiMinder®, comme détaillé en section 4.1.1. Pour rappel, il s'agissait de 2 échantillons composites chacun constitué de 5 points d'échantillonnage différents sur la plage, et de 2 échantillons ponctuels eux-mêmes prélevés à des points différents. Les tendances des relations entre *E. coli* et β -D-glucuronidase ont été analysées pour l'ensemble des mesures, ainsi que pour chaque échantillon séparément, et sont présentées dans les Figure 5.5 et Figure 5.6. Les échantillons composite 2 et ponctuel 1 présentent des corrélations linéaires acceptables entre *E. coli* et l'activité enzymatique ($R^2 > 0,5$), tandis que celles de l'échantillon ponctuel 2 et de l'ensemble des échantillons sont plutôt faibles ($R^2 < 0,5$). Enfin, aucune corrélation linéaire n'existe dans le cas de l'échantillon composite 1 ($R^2 \sim 0$), qui possède le plus faible coefficient de corrélation observé lors

du projet. Toutes les relations tracées pour ce site ont une pente inférieure à 1, soulignant le fait que les concentrations en bactéries augmentent plus rapidement que le signal enzymatique.

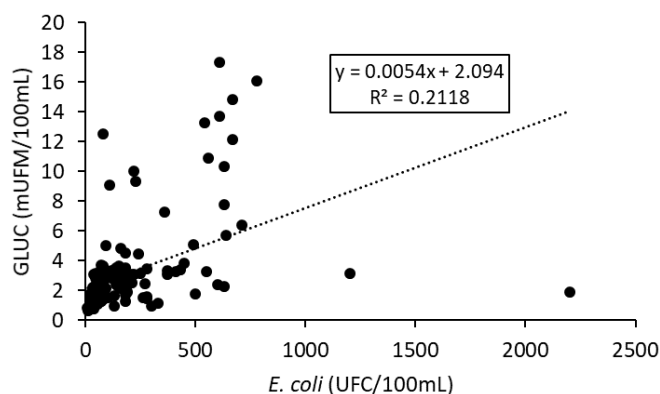


Figure 5.5: : Corrélation linéaire entre GLUC et *E. coli* cultivables, site Qc1, tous échantillons confondus (n=167 points).

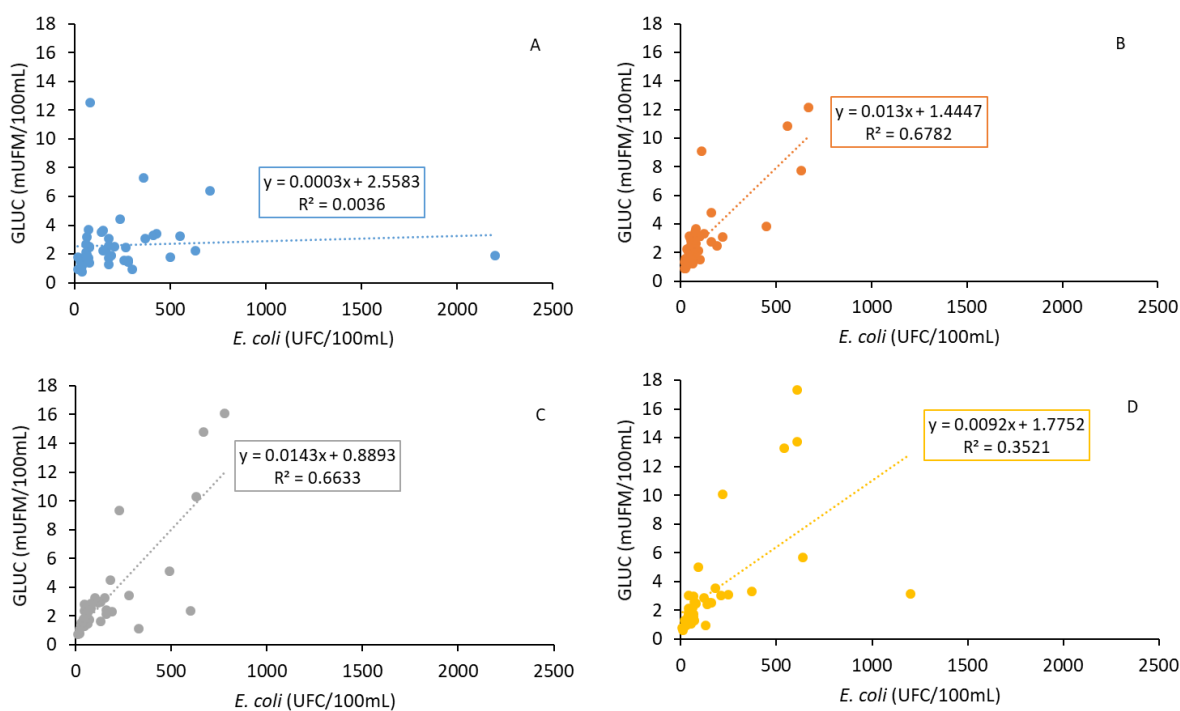


Figure 5.6: Corrélation linéaire entre GLUC et *E. coli* cultivables, site Qc1. A : échantillon composite 1 (n=45 points), B : échantillon composite 2 (n=45 points), C : échantillon ponctuel 1 (n=38 points), D : échantillon ponctuel 2 (n=39 points).

D'après la Figure 5.4, il semblerait qu'une corrélation affine existe entre le ratio GLUC/*E. coli* et les concentrations en *E. coli*. Cela signifierait donc que la corrélation entre GLUC et *E. coli* serait

un polynôme d'ordre 2. On obtient ainsi, pour toutes les données recueillies au site Qc1, un meilleur coefficient de régression R^2 égal à 0.41 et une équation de régression égale à : $y = -6.10^{-6} x^2 + 0.014 x + 1.12$ pour une régression polynomiale d'ordre 2 avec x représentant les concentrations en *E. coli* cultivables et y le signal enzymatique.

5.2.1.2 Site québécois 2

Un suivi a été mis en place sur une seconde plage en bord du Saint-Laurent entre le 25 juillet et le 13 septembre 2018, à raison d'au moins deux échantillons par jour, ou plus lors d'événements de pluie et/ou débordement. Une relation linéaire avec un coefficient de détermination acceptable ($R^2 = 0,44$) a été trouvée entre *E. coli* et β -D-glucuronidase pour ce site, comme illustré sur la Figure 5.7.

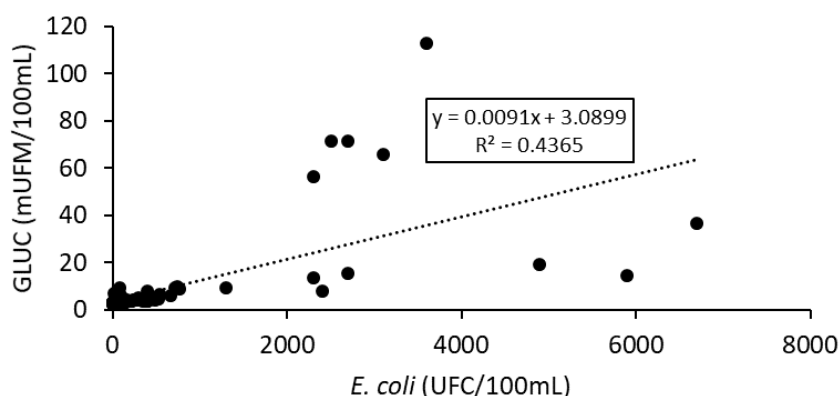


Figure 5.7: Corrélation linéaire site Qc2 (n=194 points)

Comme pour le site québécois 1, une régression polynomiale d'ordre 2 a été trouvée entre GLUC et *E. coli* avec un coefficient de régression égal à 0.59 et une équation de régression égale à $y = -3.10^{-6} x^2 + 0.024 x + 1.5$.

5.2.1.3 Nouvelle-Zélande 2018

Le dernier site sur lequel un suivi a été effectué dans le cadre de ce projet de maîtrise est la rivière Waikato dans la ville d'Hamilton, au centre de l'île Nord de Nouvelle-Zélande. Ce suivi a été effectué avec l'équipe du docteur Rebecca Stott du National Institute for Water and Atmospheric research (NIWA) entre le 20 décembre 2017 et le 13 avril 2018. Afin de comparer rigoureusement la qualité des corrélations des méthodes standards avec l'activité enzymatique, celles-ci ont été tracées en considérant seulement les échantillons pour lesquels des analyses au Colilert et par

filtration sur membrane avaient été réalisées. Les courbes ainsi obtenues sont présentées en Figure 5.8. On remarque que les deux corrélations ainsi obtenues sont similaires, autant par leur équation que par leur coefficient de régression.

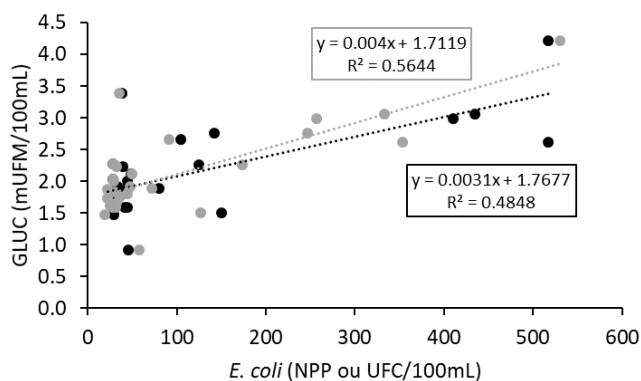


Figure 5.8: Corrélations linéaires Rivière Waikato (noir : Colilert, gris : filtration sur membrane, n=28 points)

5.2.2 Analyses par définition de seuils limites

Les méthodes standards et enzymatiques ne mesurant pas exactement la même chose, il est peu probable d'obtenir une corrélation linéaire parfaite entre *E. coli* et β -D-glucuronidase, même si certains sites présentent de bonnes corrélations. Par ailleurs, les législations concernant la protection des usagers d'eaux récréatives définissent des seuils maximaux acceptables en bactéries cultivables au-delà desquels la plage concernée est fermée (voir 2.2.2). Il apparaît alors plus judicieux de comparer les différents types de méthodes en comparant les journées où les plages sont déclarées ouvertes ou fermées, même si ces comparaisons peuvent sembler plus grossières de prime abord. Pour cela, deux types d'analyses comparatives des résultats obtenus ont été utilisées. La première a permis de définir les seuils maximums acceptables des mesures enzymatiques équivalents aux seuils réglementaires en *E. coli* pour chacun des sites étudiés. La seconde a ensuite permis de comparer les décisions de gestion de plage prises avec chacune des techniques analytiques et d'estimer si leur accord dépendait principalement du hasard ou non, grâce au calcul des coefficients κ . Les méthodologies de comparaison sont détaillées en 4.4.3.

5.2.2.1 Site québécois 1

Les méthodes de comparaison des résultats, présentées en 4.4.3, furent appliquées pour la première fois sur les données recueillies pour la première plage étudiée en bord de Saint-Laurent en 2016. Dans cette analyse les moyennes arithmétiques et géométriques des deux échantillons composites ont été estimées et ont chacune fait l'objet d'une analyse à part entière. À l'aide de matrices de confusion le seuil maximal d'activité enzymatique a été fixé à 3,1 mUFM/100mL pour les moyennes géométrique et arithmétiques des échantillons composites, 3,3mUFM/100mL et 3,0 mUFM/100mL pour les échantillons ponctuels 1 et 2 respectivement. Les pourcentages de faux-positifs, faux-négatifs et les nombres de jours de fermeture de la plage selon chacune des méthodes et pour chaque type d'échantillon, sont répertoriés dans le Tableau 5.3. Pour rappel, une mesure est considérée comme un faux-négatif si elle recommande l'ouverture de la plage alors que la culture décrète sa fermeture. Un faux-positif est au contraire quand la mesure conseille la fermeture de la plage alors que la culture permet son ouverture. Par ailleurs, pour calculer ces pourcentages les décisions de gestion de plage prises à partir du signal enzymatique ou de la culture avec les 24h de délai sont comparées à celles prises à partir des mesures de culture sans délai de 24h, ces dernières étant considérées comme étant les plus représentatives de la qualité microbiologique actuelle de l'eau.

Les mesures de l'activité enzymatique aboutissent généralement à plus de jours de fermeture de plage, tout en ayant des pourcentages de faux-positifs et faux-négatifs toujours inférieurs à ceux de la culture, et ce pour tous les échantillons. Il est à noter que le pourcentage de faux-négatifs de l'activité enzymatique est nul pour l'échantillon ponctuel 2 alors qu'il est de près de 16% avec la culture.

Tableau 5.3 : Matrice de confusion finale, site Qc1

	Activité enzymatique			Culture		
	Jours fermés	Faux- positifs (%)	Faux- négatifs (%)	Jours fermés	Faux- positifs (%)	Faux- négatifs (%)
Composites moyenne géométrique (n=42)	9	9,5	2,0	6	12,2	12,2
Composites moyenne arithmétique (n=42)	9	9,5	10	9	19,5	19,5
Ponctuel 1 (n=38)	7	2,6	5,0	8	16,2	16,2
Ponctuel 2 (n=39)	12	7,7	0	9	15,8	15,8

Le Tableau 5.4 regroupe les résultats de l'analyse de comparaison des décisions de gestion de plages résultant des mesures par culture et par détection enzymatique. Il en ressort que les pourcentages d'accord entre culture et mesure d'activité enzymatique sont tous supérieurs à 60%, indiquant un accord global satisfaisant entre les deux techniques. Cependant, il apparaît que les κ correspondent tous à une absence d'accord entre GLUC jour i et *E. coli* jour $i-1$, tandis qu'ils sont au moins « Modéré » entre les mesures de culture et d'activité enzymatique d'un même échantillon, à l'exception de la moyenne arithmétique des échantillons composites. Enfin, les pourcentages de faux-positifs et faux-négatifs sont toujours supérieurs entre GLUC jour i et *E. coli* jour $i-1$ qu'entre GLUC et *E. coli* du jour $i-1$.

Tableau 5.4: Résultats de l'analyse d'accord dans la gestion de plages de la culture et de la détection enzymatique, site Qc1

	GLUC jour i vs <i>E. coli</i> jour $i-1$				GLUC jour $i-1$ vs <i>E. coli</i> jour $i-1$			
Échantillons	Composites moyenne géométrique (n=42)	Composites moyenne arithmétique (n=42)	Ponctuel 1 (n=38)	Ponctuel 2 (n=39)	Composites moyenne géométrique (n=42)	Composites moyenne arithmétique (n=42)	Ponctuel 1 (n=38)	Ponctuel 2 (n=39)
Accord global (%)	68,29	60,98	70,27	60,53	87,80	80,49	91,89	92,11
Faux-négatifs (%)	12,20	19,51	16,22	15,79	2,44	9,76	5,41	0
Faux-positifs (%)	19,51	19,51	13,51	23,68	9,76	9,76	2,70	7,89
κ	-0,05 – Aucun (-0,52 – 0,42)	-0,14 – Aucun (-0,57 – 0,30)	0,08 - Aucun (-0,37 – 0,54)	0,02 - Aucun (-0,36 – 0,41)	0,60 - Modéré (0,26 – 0,93)	0,43 - Faible (0,08 – 0,78)	0,75 - Modéré (0,48 – 1)	0,80 - Fort (0,59 – 1)

5.2.2.2 Site québécois 2

Les données de la seconde plage québécoise, obtenues lors d'un déploiement en 2018, ont aussi fait l'objet d'une analyse comparative par seuils. Ici, le seuil maximal acceptable pour l'activité GLUC fut fixé à 3,4mUFM/100mL. Il est important de spécifier ici que certains délais considérés dans cette étude entre les échantillons pour culture et ceux pour mesure d'activité enzymatique sont supérieurs à 30 minutes. Par ailleurs, lors de ce déploiement des mesures à haute fréquence (toutes les heures) ont été réalisées lors d'événements de pluie et/ou surverse, et ces données ont été considérées dans les matrices de confusion pour la définition du seuil d'action en mUFM/100mL. Le « nombre de fermetures » ne correspond donc pas à un nombre de jours durant lesquels la plage serait fermé mais au nombre de décisions de fermeture qui seraient prises selon les deux techniques d'analyse. Les résultats de la matrice de confusion finale sont rassemblés dans le Tableau 5.5.

Tableau 5.5 : Matrice de confusion finale, site Qc2 (n = 196 points)

	Activité enzymatique			Culture		
	Nombre de fermetures	Faux-positifs (%)	Faux-négatifs (%)	Nombre de fermetures	Faux-positifs (%)	Faux-négatifs (%)
Qc2	69	16,8	0	36	2,1	2,1

On observe alors que le nombre de fermetures et le pourcentage de faux-positifs sont supérieurs avec les mesures d'activité GLUC, mais un pourcentage de faux-négatifs nul est également obtenu avec cette technique contre plus de 2% pour la culture.

Dans un second temps, seules les données qui auraient été obtenues lors d'un suivi de routine de la plage (soit un échantillon chaque matin) ont été considérées pour la comparaison des décisions de gestion de plage. Les résultats de cette analyse sont rassemblés dans le Tableau 5.6. Des accords globaux de 97% et 100% sont ainsi obtenus, avec des pourcentages de faux-positifs nuls et des κ de 0,65 et 1, ce dernier soulignant l'accord parfait entre les mesures de GLUC et de culture pour les échantillons prélevés simultanément. Ces bons résultats valident ainsi le seuil en mUFM/100mL défini pour ce site.

Tableau 5.6: Résultats de l'analyse d'accord dans la gestion de plages de la culture et de la détection enzymatique, site Qc2 (n = 39 points)

	GLUC jour <i>i</i> vs <i>E. coli</i> jour <i>i</i> -1	GLUC jour <i>i</i> -1 vs <i>E. coli</i> jour <i>i</i> -1
Accord global (%)	96,97	100
Faux-négatifs (%)	3,03	0
Faux-positifs (%)	0	0
κ	0,65 – Modéré (-0,02 – 1)	1 – Parfait (1 – 1)

5.2.2.3 Nouvelle-Zélande 2018

Le dernier site ayant fait l'objet de cette étude comparative est la rivière Waikato. Comme explicité dans la partie 2.2.2, deux seuils d'*E. coli* sont définis pour les eaux récréatives néo-zélandaises. Le premier, le seuil "alarme", est à 260 UFC/100mL. Son équivalent pour l'activité enzymatique a été fixé à 3,9 mUFM/100mL. Un événement faux-alarme représente ainsi un événement durant lequel le signal enzymatique ou les résultats de culture avec 24h dépassent le seuil d'alarme alors que la culture sans 24h non. L'autre seuil, celui de fermeture, est fixé à 550 UFC/100mL, correspondant à 5 mUFM/100mL pour l'étude. Seules les données d'*E. coli* mesurées par Colilert ont été considérées, et les résultats sont présentés dans le Tableau 5.7. Le pourcentage de faux-négatifs est ainsi nul pour les mesures enzymatiques alors qu'il est de 1,2% pour la culture. Les pourcentages de fausses alarmes et de faux-positifs sont cependant plus faibles pour la culture.

Tableau 5.7: Matrice de confusion finale, site NZ (n = 257 points)

	Activité enzymatique			Culture		
	Faux- alarme (%)	Faux- positifs (%)	Faux- négatifs (%)	Faux- alarme (%)	Faux- positifs (%)	Faux- négatifs (%)
Site NZ	12,5	5,1	0	8,2	0,8	1,2

Comme précédemment, seuls les résultats qui auraient été obtenus lors d'un suivi de routine d'un échantillon par jour ont été considérés dans les calculs de l'accord de décision entre les mesures de culture par Colilert et celles d'activité enzymatique par ColiMinder®. Les résultats sont présentés dans le Tableau 5.8.

Tableau 5.8 : Résultats de l'analyse d'accord dans la gestion de plages de la culture et de la détection enzymatique, site NZ (n = 37 points)

	GLUC jour <i>i</i> vs <i>E. coli</i> jour <i>i</i> -1	GLUC jour <i>i</i> -1 vs <i>E. coli</i> jour <i>i</i> -1
Accord global (%)	80,6	86,1
Faux-négatifs (%)	2,78	0
Faux-positifs (%)	5,56	2,78
κ	0,61 – Modéré (0,18 – 1)	0,84 – Fort (0,53 – 1)

Il ressort une nouvelle fois de cette analyse que l'accord entre activité enzymatique et culture sur des échantillon espacés de 24h est plus faible que celui entre ces deux mêmes techniques appliquées sur des échantillons prélevés simultanément.

5.3 Suivi d'un évènement, Grande région de Montréal

Un évènement de fortes pluies avec surverses d'égout durant l'été 2018 a fait l'objet d'un suivi quasi-continu pendant 48h, entre le 17 juillet 2018 et le 19 juillet 2018, sur un site de la grande région de Montréal. Lors de ce suivi, un ColiMinder® mesurait l'activité enzymatique associée à la β -D-glucuronidase toutes les heures. Un échantillonneur automatique était également programmé afin de prélever sur un cycle horaire un échantillon d'un litre, en même temps que le ColiMinder® prenait une mesure (à l'exception de 9 mesures présentant 25 min de décalage entre les deux appareils). À la suite d'une diminution du signal enzymatique, seuls les échantillons prélevés aux heures paires entre le 17 juillet 18h et le 18 juillet 8h, puis aux 3h entre 18 juillet 8h et 18 juillet 11h, et enfin aux 4h entre 18 juillet 11h et 19 juillet 7h, ont été analysés par filtration sur membrane et mesure de turbidité au laboratoire. Le ColiMinder® a été laissé en cycle horaire tout du long. Les évolutions des différents paramètres mesurés au cours de cet évènement sont illustrées sur la Figure 5.9, de même que les périodes de surverse.

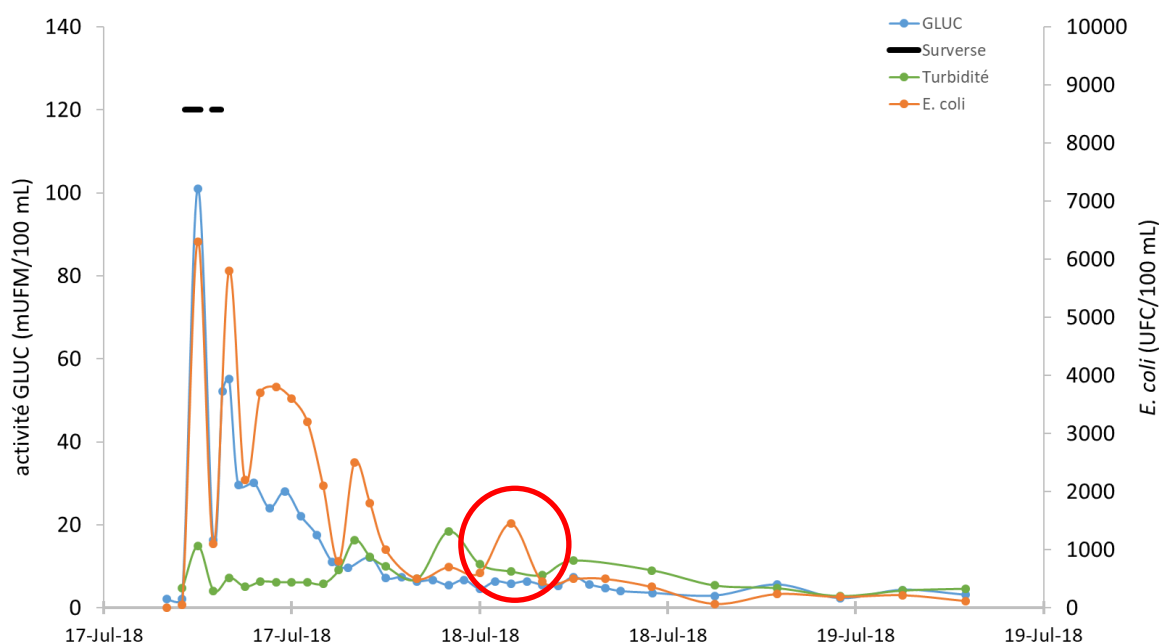


Figure 5.9: Évolutions temporelles du signal du ColiMinder®, de la concentration en *E. coli* et de la turbidité lors d'un évènement de pluie avec surverse dans la grande région de Montréal

Les pics d'*E. coli* et de β -D-glucuronidase ont lieu en même temps, pendant les deux surverses observées. Les pointes de turbidité sont observées concomitamment à celles des bactéries et enzymes. De plus, les deux pointes les plus importantes en bactéries et enzymes ont lieu

conjointement avec les surverses. Une bonne concordance globale des évolutions temporelles des différents paramètres mesurés tout au long du suivi peut être notée, à l'exception du 18 juillet (cercle rouge) où une nouvelle pointe d'*E. coli* apparaît alors que le signal enzymatique demeure stable.

La corrélation linéaire entre les mesures enzymatiques et celles par culture durant cet évènement a été évaluée, tel qu'illustré à la figure 5.10. Un bon coefficient de corrélation est obtenu ($R^2 > 0,8$), mais il faut rappeler ici que seuls 28 points sont considérés. De plus, la gamme de concentrations couvre plusieurs ordres de grandeur ce qui étire les points et permet d'avoir une meilleure corrélation linéaire.

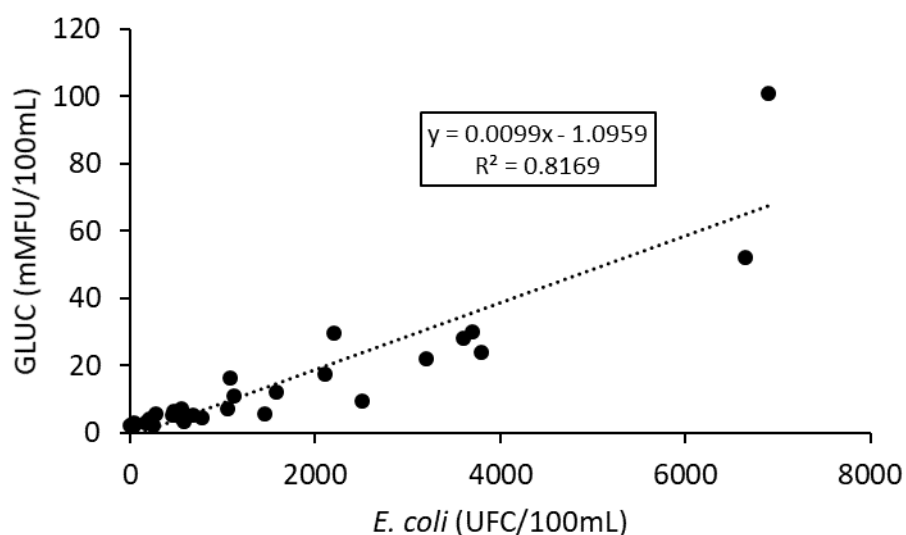


Figure 5.10: Corrélation linéaire entre les résultats enzymatiques et ceux du dénombrement par la culture pendant un évènement de pluie dans la grande région de Montréal (n=28 points)

CHAPITRE 6 DISCUSSION

6.1 Compréhension du signal du ColiMinder®

6.1.1 Expérience de répétabilité

L'expérience de répétabilité réalisée durant l'été 2018 a permis de mettre en évidence que le coefficient de variation est beaucoup plus faible pour le ColiMinder® (jusqu'à 9 fois plus faible que celui du TECTA™ pour *E. coli*), et ce pour les deux échantillons analysés. Ces observations sont en accord avec celles de Burnet et al. (2019), dont le coefficient de variation du ColiMinder® (entre 0,9 et 5,8 %) était également inférieur à ceux du TECTA™ (entre 17,9 et 46,2 %), du Colilert (entre 12,4 et 34,0 %), de la culture sur MI agar (entre 7,7 et 34,5 %) et de la PCR en temps réel (entre 31,8 et 46,6 %). Ainsi, la variabilité y était 5 à 8 fois plus importante pour les autres techniques (surtout la culture et la qPCR) que pour le ColiMinder®, quel que soit le niveau de contamination (entre 50 et 2333 UFC/100mL), pour des échantillons d'eau brute à l'entrée d'une usine de potabilisation de l'eau de la grande région de Montréal, similaires aux échantillons de ce projet. Par ailleurs, il y est aussi démontré que lorsqu'un même échantillon est analysé par trois ColiMinder® différents, le coefficient de variation est en moyenne de 3,5 % en temps sec et 3,6 % pendant un événement de pluie. De plus, les coefficients de variation documentés antérieurement pour des techniques fournissant des résultats en NPP, comme la technologie Colilert (IDEXX, États-Unis), sont de l'ordre de 30 % (Prats, Garcia-Armisen, Larrea, & Servais, 2008), ce qui est en accord avec ceux obtenus lors de cette étude, avec une moyenne de 27 % pour les deux échantillons, coliformes totaux et *E. coli* confondus. Enfin, les deux géloses utilisées pour la culture après filtration sur membrane des échantillons présentent des coefficients de variation similaires pour les deux échantillons et entre opérateurs. Les répétabilité et reproductibilité de cette technologie autonome de mesure enzymatique sont donc très bonnes, et meilleures que celles des méthodes standards actuellement employées en routine.

Par ailleurs, de plus grands coefficients de variation sont obtenus avec l'échantillon le moins contaminé, et ce pour toutes les techniques étudiées. Cela est dû au fait que pour une faible contamination, une petite variation dans le résultat de la mesure correspond à un grand pourcentage de la valeur finale, donc le pourcentage de variation paraît plus grand. On observe par exemple que plus l'échantillon est contaminé, plus le coefficient de variation de la filtration sur membrane

diminue. Cette même corrélation a aussi été remarquée par Burnet et al. (2019). De plus, plus l'échantillon est contaminé plus il est probable de détecter la contamination quelle que soit la méthode employée. En effet, plus il y a de bactéries dans un même volume, plus il est probable d'en détecter au moins une.

Au contraire, pour l'échantillon le plus contaminé, les coefficients de variation entre opérateurs du Colilert diminuent de plus de moitié alors que ceux des deux géloses augmentent (de 0,2% pour MI agar et de 2,1% pour mFC BCIG). Cette différence peut s'expliquer par le fait qu'avec une contamination plus importante, les cases du Quanti-Tray/2000 (IDEXX, États-Unis) apparaissent bien jaunes et/ou fluorescentes diminuant ainsi le risque d'hésitation de la part des lecteurs. Ils ont donc tous les mêmes résultats à peu de chose près. Alors que pour les cultures sur gélose, plus l'échantillon est contaminé, plus il y a de colonies sur la gélose pour un même volume filtré. Il est donc plus compliqué de les compter sans en oublier ou en compter en double, et les opérateurs ont donc un plus grand risque d'avoir des comptes différents, augmentant le pourcentage de variation entre eux. Par ailleurs, une forte densité de colonies sur une même gélose peut engendrer des chevauchements de ces dernières et en compliquer, voire fausser le décompte (World Health Organization & OECD, 2003). Ce contraste de répétabilité selon le niveau de contamination a aussi été souligné par Muirhead et Meenken (2018). En effet, leur étude a montré que la variabilité des mesures des concentrations en *E. coli* par Colilert, sur une fréquence horaire dans trois rivières de tailles différentes en Nouvelle-Zélande, est plus élevée en hiver qu'en été et les auteurs attribuent cette différence au fait que les concentrations moyennes relatives sont plus basses en hiver qu'en été. Enfin, Heery et al. (2015) ont aussi trouvé, avec une technologie de quantification de l'activité GLUC appelée ColiSense, des coefficients de variation plus élevés pour des concentrations plus faibles ($CV > 23\%$) que pour des concentrations élevées ($CV < 1\%$). Tout ceci concorde avec le fait que la variabilité du signal enzymatique est plus grande pour un échantillon avec une concentration plus faible d'*E. coli*.

6.1.2 Signal en phase soluble

D'après les résultats des mesures du signal enzymatique en phase soluble, il ressort que ce signal a peu d'impact sur les corrélations entre les mesures de β -D-glucuronidase et la culture sur gélose Brilliance agar ou Colilert. Cependant, ce signal représente parfois une grande fraction du signal total : il correspond en moyenne à 22 % du signal global du site NZ, ce qui n'est pas négligeable.

Cela est quelque peu différent des résultats de Farnleitner et al. (2001). Dans cette étude de plusieurs rivières autrichiennes, l'activité enzymatique mesurée était principalement due à des bactéries *E. coli* en suspension, sans interférence d'autres bactéries ou substances, et le signal après filtration sur 0,45µm ne représentait qu'environ 10 % du signal total, soit en moyenne moitié moins que dans le cas de la rivière Waikato. Cependant, pour des échantillons prélevés à différentes étapes d'une station d'épuration des eaux usées, il a été montré que pour des concentrations en coliformes thermotolérants supérieures à 2300 UFC/100mL, la réponse au test enzymatique était proportionnelle aux concentrations de ces coliformes. Pour des concentrations plus faibles, un fort signal bruit de fond indépendant des coliformes thermotolérants était toutefois observé. Celui-ci était certainement dû à la présence d'enzymes libres ou d'autres substances capables d'hydrolyser le substrat (Davies & Apte, 2000). Pour la rivière Waikato, la forte proportion d'enzyme libre pourrait être due à la présence de barrages le long de la rivière, dont un juste avant son entrée dans la ville de Hamilton. L'eau étant retenue aux barrages, les bactéries se trouvent dans une eau stagnante et sont directement soumises aux radiations solaires, entraînant des dommages et une transition dans un état de dormance (Barcina, Gonzalez, Iriberry, & Egea, 1989). Une fois l'eau relâchée, parfois assez brusquement, les bactéries présentes pourraient alors se trouver lysées, ou leur membrane pourrait tout du moins s'en trouver endommagée et des enzymes comme la β -D-glucuronidase se retrouveraient alors en phase soluble. Elles resteraient détectables au ColiMinder® car l'enzyme GLUC est plus persistante dans l'environnement que ne le sont les bactéries *E. coli* (Fiksdal & Tryland, 2008), tandis que les cellules auraient perdu leur capacité à se reproduire sur un milieu de culture.

6.1.3 Ratios

Des corrélations avec des R^2 supérieurs à 0,5 sont observées pour tous les sites entre le ratio GLUC/*E. coli* et les concentrations en *E. coli* cultivables, même lorsque que les coefficients de corrélation entre GLUC et *E. coli* sont plutôt faibles (inférieurs à 0,4). Par exemple, pour l'échantillon composite 1 du site Qc1, le coefficient de corrélation linéaire R^2 entre GLUC et *E. coli* est égal à 0,0036, soit le plus faible de tous les sites, alors qu'il est de 0,74 entre GLUC/*E. coli* et *E. coli*. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le ratio GLUC/*E. coli* permettrait de fournir des renseignements sur le type de contamination fécale impactant le site. Ainsi, Converse et al. (2012) ont étudié le ratio entre les *Enterococcus* spp. cultivables et ceux détectés par qPCR sur trois pages

de Californie. Leur étude a montré que ce ratio variait à la fois dans le temps et dans l'espace, et qu'il était notamment plus faible pour les plages impactées par des pollutions fécales diffuses et qu'il était plus proche de 1 dans le cas d'une contamination concentrée et ponctuelle.

L'étude des ratios GLUC/*E. coli* semble par ailleurs indiquer que le ratio GLUC/*E. coli* diminue avec des concentrations croissantes en *E. coli*, impliquant le fait que plus la contamination est importante, plus la quantité de bactéries pour avoir une même quantité d'enzyme est grande. Cette observation fait écho à celles de Garcia-Armisen et al. (2005). En effet, leur équipe a montré que la quantité de β -D-glucuronidase par *E. coli* viable (mesurée par DVC FISH) était à peu près constante, et ce quel que soit le niveau de contamination de l'échantillon ; alors que la quantité d'enzyme par bactérie cultivable diminuait lorsque la contamination devenait plus importante. Cette diminution du ratio GLUC/*E. coli* cultivable dans des milieux plus biologiquement pollués peut s'expliquer par la sous-estimation du nombre de bactéries fécales dans des environnements peu contaminés avec les méthodes de culture, à cause d'une fraction plus importante de ces bactéries à l'état VBNC (Viable But Non Culturable). L'accroissement de cette fraction serait dû à des stress environnementaux accrus et généralement plus longs en cas de faible contamination, comme des radiations solaires pouvant mieux pénétrer dans l'eau, ou un manque de nutriments (Garcia-Armisen et al., 2005; Servais, Prats, Passerat, & Garcia-Armisen, 2009). Les mêmes observations et explications sont faites par Farnleitner et al. (2001) pour différentes rivières autrichiennes. George et al. (2000) sont aussi arrivés à la conclusion que l'activité enzymatique par coliforme cultivable augmente lorsque leur nombre diminue, et ce pour des échantillons issus de rivières françaises et belges. Fiksdal et al. (1994) sont arrivés à la même conclusion lors de leur étude de deux estuaires, un se situant en Bretagne et l'autre en Norvège.

Les bactéries à l'état VBNC peuvent être détectées par différentes méthodes, les plus fiables étant celles impliquant la ressuscitation des bactéries. D'autres techniques comme la cytométrie de flux combinée à l'utilisation de colorant pour distinguer les cellules vivantes des mortes (en supposant que les bactéries ne sont plus viables lorsque leur membrane est trop abîmée, et laisse ainsi pénétrer de grosses molécules de colorant), ou la PCR à partir d'un échantillon d'ARN ont été développées pour détecter les bactéries VBNC dans des échantillons naturels, sans étape de culture (Stokell & Steck, 2012). Néanmoins, ces techniques restent complexes et ne peuvent pour l'instant être couplées à une technologie enzymatique automatisées comme celle employée lors de ce projet. Par ailleurs, le signal enzymatique (représentant toutes les bactéries actives ainsi que les enzymes

GLUC actives libres en solution) étant dans une unité différente des mesures faites par culture (ne représentant que les bactéries cultivables), il n'est pas à ce jour possible d'estimer directement le nombre de VBNC par soustraction des résultats de culture au signal enzymatique, même si cela aurait pu permettre d'améliorer les corrélations linéaires obtenues.

6.2 Application du ColiMinder® aux eaux récréatives

6.2.1 Corrélations linéaires

Le tracé de corrélations linéaires entre les concentrations en *E. coli* et le signal enzymatique mesuré par ColiMinder® sur différents sites apporte plusieurs informations. Tout d'abord, le coefficient de corrélation R^2 est propre à chaque site, et semble dépendre de l'environnement et de l'utilisation faite des terres autour du point d'eau à l'étude. Pareillement, un r de 0,53 a été trouvé entre GLUC et *E. coli* pour des eaux souterraines dans les alpes autrichiennes par Ryzinska-Paier et al. (2014), tandis qu'aucune corrélation n'avait été trouvée pour des eaux souterraines près de Vienne par la même équipe. Enfin, selon Stadler et al. (2016), les différences de corrélations entre β -D-glucuronidase et *E. coli* rapportées dans les articles sont fortement dépendantes du milieu, des scénarios de débordement, ainsi que de l'âge et du type de source de contamination fécale rencontrés. La qualité de la corrélation entre enzyme et bactérie semble ainsi être propre à chaque site et devrait donc être investiguée avant chaque nouveau déploiement. Étonnamment, des R^2 très différents sont observés pour le site Qc1 entre les différents échantillons. Ainsi, pour l'échantillon composite 1 aucune corrélation linéaire n'est obtenue entre GLUC et *E. coli* cultivables ($R^2 \sim 0$), tandis que des coefficients de 0,68, de 0,66 et de 0,35 sont trouvés entre ces deux entités pour les échantillons composite 2, ponctuel 1 et ponctuel 2 respectivement. Les différences de corrélations entre les échantillons composites et ponctuels peuvent s'expliquer par le fait que ces échantillons ne sont pas prélevés de la même façon et donnent ainsi des aperçus différents de la même plage. Les différences observées entre les deux échantillons composites et entre les deux échantillons ponctuels sont pour leur part un peu plus surprenantes. La seule différence entre les échantillons de ces paires est l'emplacement du site de prélèvement sur la plage. Ainsi, il se pourrait que la marée, le vent, les contaminations fécales ponctuelles et diffuses aient un impact différent sur la qualité de l'eau selon le positionnement sur la plage (Garneau & Vanrolleghem, 2017). Cela rejoint les conclusions de Converse et al. (2012) qui avançaient que la relation empirique entre culture et

qPCR pour mesurer les *Enterococcus* spp. dans des eaux salées de Californie n'était pas universelle, mais qu'au contraire elle variait même au sein d'une même plage. Ces résultats montrent ainsi que la corrélation entre enzyme GLUC et *E. coli* est aussi dépendante de la stratégie et du protocole d'échantillonnage appliqués. Ceux-ci étant différents pour chaque site, il est important de prendre ce facteur en compte avant d'y déployer une technologie enzymatique.

Par ailleurs, pour tous les sites étudiés lors de ce projet, les coefficients de corrélation entre l'activité enzymatique et les concentrations en *E. coli* sont assez moyens (entre 0,0036 et 0,6782, soit en moyenne égal à 0,44). Un coefficient assez similaire ($r=0,53$) a été trouvé pour une source d'eau souterraine dans les alpes autrichiennes par Ryzinska-Paier et al. (2014). Les auteurs soulignent qu'ils ont trouvé de meilleures corrélations entre l'enzyme β -D-glucuronidase et la turbidité, l'adsorption à 254nm, ou encore les concentrations en galactosidase, qu'entre GLUC et *E. coli*. D'autres études ont pour leur part permis de mettre en lumière de bonnes corrélations entre β -D-glucuronidase et les concentrations en *Escherichia coli*. Garcia-Armisen et al. (2005) ont ainsi trouvé un coefficient de corrélation $R^2 = 0,92$ entre le logarithme décimal de GLUC et celui des concentrations en *E. coli* cultivables, et un R^2 de 0,93 entre le logarithme décimal de GLUC et celui des concentrations en *E. coli* viables. Pareillement, Farnleitner et al. (2001) ont mis en évidence un coefficient de corrélation R^2 égal à 0,87 entre le logarithme décimal de GLUC et celui des concentrations en coliformes fécaux, et un R^2 de 0,90 entre logarithme décimal de GLUC et celui d'*E. coli*. Le groupe nommé coliformes fécaux est principalement constitué des bactéries *Escherichia coli* et des bactéries *Klebsiella*, cette dernière ne possédant pas l'enzyme β -D-glucuronidase. Il est donc logique que la corrélation entre GLUC et les coliformes fécaux soit bonne, mais moins bonne que celle entre GLUC et *E. coli* seule. Dans cette étude, les auteurs ont également souligné que la corrélation trouvée entre le logarithme de GLUC et celui des coliformes fécaux était meilleure que celles rapportées dans d'autres articles. Un niveau plus faible de contamination dans ces eaux vives, de même que l'utilisation de filtres et milieux de culture différents pourraient expliquer les différences de qualité de corrélations entre ces paramètres. Néanmoins, un bon coefficient de corrélation de 0,83 a aussi été trouvé entre les coliformes fécaux et GLUC pour des échantillons issus de rivières françaises et belges (George et al., 2000). De même, des coefficients de corrélation égaux à 0,77 entre le signal du ColiMinder® et les mesures d'*E. coli* par Colilert, à 0,73 entre l'activité enzymatique et la culture, et à 0,5 entre un ColiMinder® et un TECTA™ et le signal du ColiMinder® et les résultats de qPCR ont été démontrés par Burnet

et al. (2019). Les moins bonnes corrélations obtenues entre la détection enzymatique en ligne et les techniques TECTA™ et qPCR peuvent s'expliquer par le fait que ces dernières ont une variabilité plus grande (voir 6.1.1), et que moins de points étaient disponibles pour la comparaison. Par ailleurs, de meilleures relations ont été trouvées entre culture et Colilert ($r=0,94$), entre culture et TECTA™ ($r=0,91$) et entre Colilert et TECTA™ ($r=0,92$). Là encore, les variabilités intrinsèques de ces méthodes pourraient expliquer ces meilleures concordances. Le site étudié par Burnet et al. (2019) était principalement impacté par des rejets d'eaux usées humaines, traitées aux UV ou seulement partiellement dans le cas de surverses. Dans le cas de surverses, ce sont des contaminations fraîches avec une grande proportion de bactéries cultivables qui sont détectées, expliquant ainsi les meilleures corrélations entre ColiMinder® et culture, que dans des cas de contaminations plus anciennes, avec plus de bactéries VBNC. Enfin, une comparaison des technologies ColiMinder® et BACTcontrol sur un bassin versant alimenté par un ruisseau traversant des zones agricoles, a permis de mettre en avant des corrélations assez moyennes entre le signal du ColiMinder® et les mesures d'*E. coli* par Colilert ($R^2=0,52$), et entre les mesures du BACTcontrol et celles par Colilert ($R^2=0,47$) (Stadler et al., 2016). La meilleure correspondance entre ColiMinder® et Colilert qu'entre Colilert et BACTcontrol peut s'expliquer par le fait que les mesures de ce dernier étaient généralement supérieures à celles du ColiMinder®, indiquant une possible surestimation de la contamination. Cette étude a également montré que les corrélations étaient meilleures lors d'évènements de pluie ou de fonte des neiges, apportant des coefficients de corrélation allant jusqu'à 0,8.

Au regard des graphiques obtenus lors de ce projet de maîtrise, il apparaît que les déviations les plus importantes vis-à-vis des relations linéaires calculées adviennent principalement pour des concentrations en *Escherichia coli* inférieures à 1000 UFC/100mL. Cela est vrai pour tous les sites, que les concentrations d'*E. coli* soient estimées par dénombrement sur gélose ou avec la technique Colilert. La même observation a été faite par Burnet et al. (2019). Une explication possible serait que dans les milieux faiblement contaminés d'après les méthodes de culture, la fraction de bactéries à l'état VBNC est plus grande, résultant en un signal enzymatique relativement élevé mais en de faibles comptes de colonies sur gélose. Les méthodes enzymatiques seraient aussi capables de détecter de faibles variations dans la quantité d'enzyme qui peut varier d'une bactérie à l'autre, ou d'un échantillon à l'autre même si la quantité totale de bactéries *E. coli* est la même, tandis que la culture ne détectant que les organismes cultivables, un même nombre de bactéries cultivables dans

deux échantillons aboutit au même nombre de colonies sur les géloses. En outre, il se pourrait que des substances capables de produire ou d'imiter l'enzyme β -D-glucuronidase soient en plus grande densité qu'*E. coli* dans les milieux peu contaminés, et faussent ainsi le signal enzymatique mesuré (Tryland & Fiksdal, 1998).

D'autre part, les coefficients de corrélation obtenus entre GLUC et les concentrations en *E. coli* pour la rivière Waikato sont assez similaires, que ces dernières soient estimées par culture ou par Colilert. Ainsi, la technique employée a peu d'impact même si les relations semblent un peu meilleures avec la culture. On aurait pu s'attendre à la situation inverse puisque la technique Colilert est aussi basée sur l'activité enzymatique des *E. coli* pour les identifier, mais cette technique fournit le nombre le plus probable d'unités formant colonies, ce dernier étant estimé à partir de la loi de Poisson et n'étant donc pas le nombre exact d'UFC dans l'échantillon analysé. De plus grandes variations de résultats sont ainsi obtenues pour les méthodes NPP (Prats et al., 2008).

La dernière constatation est que les pentes des corrélations linéaires obtenues sont toutes inférieures à 1, quel que soit le site étudié. Le même constat est fait dans les études de Stadler et al. (2016), Farnleitner et al. (2001), et Garcia-Armisen et al. (2005) dont l'article comporte même un tableau rassemblant les pentes trouvées dans d'autres études, et toutes sont inférieures à 1. Le seul cas où la pente est très proche de l'unité (égale à 0,994) est pour la relation entre le logarithme décimal de GLUC et celui des *E. coli* viables estimées par DVC FISH (Garcia-Armisen et al., 2005). Ces pentes plus faibles que 1 signifient que les concentrations en *E. coli* augmentent plus rapidement que l'activité enzymatique de β -D-glucuronidase. L'activité par cellule cultivable diminue donc quand le nombre de cellules augmente, soit dans les environnements plus contaminés (Farnleitner et al., 2001). En effet, une pente égale à 1 signifierait que le signal enzymatique et les concentrations en *E. coli* cultivables évolueraient de la même façon, conjointement, quel que soit le niveau de contamination rencontré. Pour expliciter ce phénomène de pente inférieure à 1, George et al. (2000) ont proposé et testé trois hypothèses :

- (1) Le nombre de coliformes présents influence l'activité mesurée par coliforme. Or, une pente de 0,99 a été trouvée pour diverses dilutions d'échantillons très contaminés, prouvant que l'activité enzymatique et le nombre de coliformes fécaux étaient liés.

- (2) Des bactéries non cibles interfèrent dans les tests enzymatiques. Or il a été montré que l'activité de β -D-glucuronidase des bactéries autres que *E. coli* est plus faibles de plusieurs ordres de grandeur, elles devraient donc se trouver en densité beaucoup plus importantes qu'*E. coli* pour interférer significativement (Tryland & Fiksdal, 1998). Aucune preuve expérimentale n'a pu être apportée.
- (3) Enfin, les pentes inférieures à 1 sont dues à des bactéries VBNC (métaboliquement actives mais non détectables par culture). Comme expliqué précédemment, la proportion de ces bactéries est plus grande dans les milieux peu contaminés à cause des stress environnementaux. Cette dernière hypothèse apporte une explication partielle aux pentes toujours inférieures à l'unité.

Finalement, certes les corrélations linéaires directes entre signal enzymatique et concentrations en *E. coli* ne sont pas parfaites (parfois même très moyennes), mais cela s'explique par le fait que les méthodes enzymatiques détectent toutes les bactéries possédant l'enzyme β -D-glucuronidase active, qu'elles soient cultivables ou non, et mêmes les cellules supposées mortes (ayant subi des UV ou un manque important de nutriments) (Petit, George, & Servais, 2000), tandis que seules les bactéries capables de former des colonies sont comptabilisées par les méthodes de culture. C'est pourquoi ces dernières sous-estiment généralement le nombre de bactéries dans les échantillons analysés. Enfin, il est important de souligner la plus longue persistance de l'enzyme dans l'environnement en comparaison à celle d'*E. coli* (Fiksdal & Tryland, 2008).

6.2.2 Analyses par définition de seuils limites

Les comparaisons par définition de seuils réalisées lors de ce projet ont permis de mettre plusieurs particularités en évidence. Tout d'abord, les pourcentages de faux négatifs obtenus dans les matrices de confusion pour fixer le seuil en mUFM/100mL sont toujours inférieurs pour la détection enzymatique, quel que soit le site analysé. Pour rappel, un faux-négatif est ici lorsque la décision est d'ouvrir la plage alors que la culture sans 24h impose sa fermeture. Il est donc primordial pour la santé des usagers que ce pourcentage soit très faible, voire idéalement nul. Sur base des pourcentages, la technologie enzymatique est donc plus protectrice que la méthode actuelle. De plus, dans son cahier des charges pour la technologie idéale de détection rapide d'*E. coli*, l'UNICEF requerrait des pourcentages de faux-négatifs inférieurs à 5%, ce qui est atteint pour tous les sites avec les seuils de GLUC définis sauf pour la moyenne arithmétique des échantillons

composites du site Qc1 (UNICEF, 2017). Cependant, les résultats de cette première étude comparative montrent aussi que les plages à l'étude seraient plus souvent fermées en se basant sur l'activité GLUC, ce qui pourrait avoir un impact négatif sur l'économie locale puisque les usagers pourraient moins souvent se rendre à la plage. Néanmoins, l'activité GLUC étant connue quasi-instantanément, la plage pourrait être réouverte dès que le signal enzymatique serait repassé sous le seuil, tandis qu'il faudrait attendre 24h avec la culture. Comme dans de nombreux cas d'études environnementales, il faut donc savoir trouver un compromis entre la protection de la population et les rendements économiques.

Les pourcentages de faux-positifs obtenus sont toujours supérieurs à ceux des faux-négatifs pour la technologie enzymatique. La présence de bactéries VBNC, donc détectables par mesure enzymatique mais non par culture, de bactéries mortes ayant encore des enzymes actives, ainsi que des enzymes libres peuvent composer le signal enzymatique mesuré (Davies & Apte, 1999), celui-ci étant ainsi supérieur au seuil fixé tandis que la quantité de bactéries cultivables reste acceptable.

De plus, grâce au cas d'étude du premier site québécois, il apparaît que l'utilisation de la moyenne géométrique plutôt que de la moyenne arithmétique pour des échantillons composites, permet de diminuer les pourcentages de faux-négatifs pour l'activité enzymatique, et le nombre de jours fermés, ainsi que les pourcentages de faux-positifs et faux-négatifs pour la culture. Cela peut s'expliquer par le fait que la moyenne géométrique de deux nombres est généralement inférieure à leur moyenne arithmétique, donc il y a moins de risque de dépasser les seuils maximaux fixés. En revanche, cela signifie aussi qu'une moyenne géométrique est un peu moins protectrice, puisqu'elle est plus régulièrement sous les seuils limites, parfois non pas parce que le risque n'est pas présent mais du fait de sa définition même. Par ailleurs, l'étude comparative considérant le hasard et le délai de 24h des méthodes de culture a montré que l'accord entre moyennes arithmétiques de l'activité enzymatique et des résultats de la culture est principalement dû à la chance, quel que soit le jour de prélèvement des échantillons. Cela peut donc justifier le choix des moyennes géométriques dans certaines des réglementations des eaux récréatives (voir 2.2.2).

Enfin, il apparaît que les pourcentages de faux-positifs et faux-négatifs pour la culture sont toujours égaux entre eux pour chaque site, à l'exception du site NZ. Les autorités néo-zélandaises définissent aussi un seuil « alarme » auquel la plage n'est pas fermée mais la fréquence d'échantillonnage est augmentée. La prise en compte d'un seuil supplémentaire ne permet donc

pas d'observer l'égalité des pourcentages observée pour les sites québécois. Cette dernière est due au délai de 24h entre la mesure de culture servant de référence et celle représentant la méthode de culture comme utilisée aujourd'hui. En effet, chaque désaccord de décision de type faux-négatif (« ouvert » pour la culture avec 24h mais « fermé » avec la culture sans 24h) fini toujours par être suivi d'un faux-positif (« fermé » pour la culture avec 24h mais « ouvert » pour la culture sans 24h), puisque la décision de culture avec 24h est basée sur celle de la culture sans 24h avec un décalage d'un jour.

Pour ce qui est des pourcentages de faux-positifs et faux-négatifs pour la méthode enzymatique, ils sont aussi liés mais pas aussi directement que pour la culture. Ainsi, un changement de la valeur seuil peut augmenter le pourcentage de faux-négatifs mais diminuer celui de faux-positifs. Lors de ce projet l'objectif principal a été la minimisation, voire l'annulation, du pourcentage de faux-négatifs, avant celle du pourcentage de faux-positifs, mais il aurait aussi été possible de fixer une valeur à atteindre pour les faux-négatifs et d'ensuite diminuer le pourcentage de faux-positifs afin de garder la plage ouverte plus de jours dans la saison sans compromettre la santé des usagers.

Dans un second temps, les analyses par comparaison de prises de décision de gestion de plage indiquent clairement que l'accord entre l'activité enzymatique du jour i et la culture du jour $i-1$ (dont les résultats sont connus au jour i) est principalement dû à la chance, avec des κ variant entre -0,14 et 0,65, donc des accords au mieux modérés. Dorevitch et al. (2017) étaient arrivés à la même conclusion dans leur comparaison des décisions de gestion de plage entre les entérocoques mesurés par qPCR au jour i et les concentrations en *E. coli* mesurées par Colilert (IDEXX, États-Unis) sur l'échantillon du jour $i-1$. Comparer ces deux méthodes peut paraître étrange mais ce sont les deux techniques recommandées par l'agence de protection de l'environnement américaine (U.S. EPA) pour le suivi de la qualité microbiologique des eaux récréatives (U.S. Environmental Protection Agency, 2012). Cela souligne les changements dans la qualité microbiologique de l'eau durant le laps de temps de 24h entre le prélèvement de l'échantillon et l'obtention des résultats des méthodes de culture. Ces variations temporelles rapides de qualité de l'eau ont notamment été démontrées par Muirhead et Meenken (2018) sur plusieurs rivières de Nouvelle-Zélande, alors que Whitman et Nevers (2004) soulignaient la faible correspondance entre les concentrations en *E. coli* au fil des jours pour des plages américaines. Les κ les plus faibles entre GLUC jour i et *E. coli* jour $i-1$ ont été obtenus sur le site Qc1, mettant en évidence une plus grande variabilité dans les

concentrations de ces deux entités sur 24h, probablement à cause de la marée qui modifie la direction du courant deux fois par jour (Garneau & Vanrolleghem, 2017).

De plus, la comparaison de décisions prises à partir des mesures d'activité enzymatique et de culture sur des échantillons prélevés simultanément montre que l'accord est ici supérieur à celui obtenu simplement par hasard. En effet, les κ varient ici entre 0,43 et 1, indiquant un accord au moins modéré, à l'exception de la moyenne arithmétique des échantillons composites du site Qc1. Cette dernière étant généralement supérieure à la moyenne géométrique, il se peut que cela accentue les divergences dans la prise de décision. Un accord parfait est obtenu entre GLUC et culture jour i-1 pour le site Qc2, confirmant la valeur de seuil mUFM/100mL choisie.

Par ailleurs, il apparaît bon de noter que le pourcentage d'accord global entre les deux techniques d'analyse était toujours bon (supérieur à 60%), même dans les cas où le κ correspondant montrait qu'aucun accord n'existait entre les méthodes une fois le facteur chance considéré. Cela souligne un peu plus l'importance de prendre en compte le hasard dans les études comparatives de plusieurs techniques analytiques, même si cela reste encore marginal dans les articles régulièrement publiés.

Finalement, cette étude comparative a mis en évidence une fois de plus la principale faiblesse des méthodes basées sur la culture, à savoir le délai de 24h entre le prélèvement de l'échantillon et l'obtention des résultats de l'analyse. Aucune décision ne peut ainsi être prise par les gestionnaires de plage le jour même de prélèvement de l'échantillon, et ils se basent alors sur les résultats de l'échantillon de la veille alors que la qualité de l'eau a certainement changé. Par ailleurs, seuls des échantillonnages occasionnels sont recommandés dans les réglementations des eaux récréatives (voir 2.2.2), mais ceux-ci ne peuvent rendre compte des variabilités spatiales et temporelles propres à chaque site des concentrations des organismes indicateurs de contamination fécale.

6.3 Suivi quasi en continu d'un évènement pluvieux avec le ColiMinder®

De bonnes concordances temporelles sont observées entre les concentrations en *E. coli*, les mesures enzymatiques, la turbidité et les surverses lors de l'évènement étudié entre le 17 et le 19 juillet 2018. Pareillement, des variations temporelles similaires entre le signal de trois ColiMinder® et des concentrations en *E. coli* mesurées par filtration sur membrane et culture sur MI agar, et par Colilert, ont été illustrées pour un suivi de trois jours à l'entrée d'eau brute d'une usine de

potabilisation de l'eau dans la grande région de Montréal (Burnet et al., 2019). Une autre étude sur un bassin versant tributaire d'un ruisseau traversant plusieurs terrains agricoles a montré que tous les événements de ruissellement engendraient une augmentation de l'activité en β -D-glucuronidase. De plus, ces pics enzymatiques semblaient alignés avec le premier flot de ruissellement de chaque événement (Stadler et al., 2016). Ici, les pics enzymatiques sont aussi accordés avec les périodes de surverses. Stadler et al. (2016) ont également conclu que les concentrations d'*E. coli* étaient corrélées avec les paramètres hydrologiques du bassin (déversement, conductivité électrique...) alors que celles en β -D-glucuronidase ne l'étaient pas. Des coefficients de corrélation de 0,22 entre l'activité de GLUC et les déversements, et de 0,24 entre GLUC et les concentrations en solides en suspension sont ainsi rapportés, alors qu'ils sont respectivement de 0,63 et 0,51 avec les concentrations en *E. coli*. Il faut néanmoins noter que plus de 3700 données étaient disponibles pour les corrélations avec l'activité enzymatique, contre seulement une cinquantaine pour les concentrations en *E. coli*. Finalement, Muirhead et Meenken (2018) ont prouvé sur différentes rivières néo-zélandaises que l'utilisation faite des sols entourant ces cours d'eau impactait les variations temporelles des concentrations en *E. coli*, de même que la taille du cours d'eau étudié. Le fleuve Saint-Laurent étant un grand fleuve à fort débit (environ 10 000m³/s en moyenne annuelle), il faut que la contamination soit importante ou localisée près de la prise d'eau pour pouvoir être détectée. Par ailleurs, la plupart des contaminations fécales observées sont dues à des rejets d'eaux usées non ou peu traitées, ainsi qu'à la fonte des neiges ou de fortes pluies qui lessivent les terrains, elles sont donc plus ou moins fraîches (Galfi, Osterlund, Marsalek, & Viklander, 2016).

D'autre part, on observe à la Figure 5.9 une ré-augmentation des *E. coli* alors que les mesures de turbidité et d'enzyme sont constantes. On pourrait alors penser à un regain de cultivabilité des *Escherichia coli* présentes sur le site étudié : plus de bactéries seraient capables de former des colonies sur les géloses mais la même quantité de β -D-glucuronidase serait produite et donc mesurée. Il est néanmoins plus probable que cela soit dû à un artefact propre à la méthode de culture elle-même. En effet, des dilutions ont été faites pour pouvoir avoir des nombres raisonnables de colonies sur les géloses, donc une légère différence dans les décomptes sur gélose une fois multipliée par le facteur de dilution peut paraître très grande.

Enfin, le suivi de cet événement pluvial permet de mettre en lumière le principal avantage du suivi quasi-continu par rapport à un échantillonnage sporadique, à savoir une diminution du risque de

manquer des pics de contamination, donc une meilleure protection de la santé des usagers des sites récréatifs. En effet, lors d'un suivi habituel de la qualité de l'eau d'un site récréatif lors de la saison de baignade, un échantillon est prélevé par jour, généralement le matin. Or on constate que si un tel suivi avait été réalisé lors de cet événement, le premier pic de contamination aurait été manqué puisqu'il a eu lieu tôt le matin, avant l'arrivée du personnel du site. Dans leur étude, Stadler et al. (2016) soulignent que le grand avantage des technologies comme le ColiMinder® est qu'elles apportent une meilleure représentation temporelle des pollutions fécales, plus détaillée et avec une haute résolution. Finalement, il a été montré que les variations temporelles d'*Escherichia coli* sont relativement importantes (Muirhead & Meenken, 2018). Or, seul un suivi quasi continu permet d'en tenir compte, de savoir quand restreindre l'accès au point d'eau et ainsi d'assurer la protection des baigneurs.

Enfin, une observation qui a été faite tout le long du suivi de la rivière Waikato est que le signal enzymatique restait relativement faible, même lors de pluies assez importantes (données non montrées). Ces faibles valeurs pourraient être dues à des substances présentes dans la rivière et qui interféreraient ou inhiberaient la détection de la fluorescence produite. Pour des eaux en circulation, il a été montré que la présence de chlorure de fer (III) (FeCl_3), d'anions hypochlorites (ClO^-), d'acide férulique, d'ions Mg^{2+} , de cadmium, ou encore celle d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), pouvait inhiber l'activité d'enzymes β -D-glucuronidase environnementales à des concentrations plus ou moins importantes (Togo et al., 2006). En comparant ces résultats avec la composition de l'eau brute à l'entrée de la station de potabilisation de l'eau de Hamilton à l'été 2013 (Hamilton City Council, 2013), aucune concentration connue des composés cités ci-dessus ne semble suffisante pour inhiber en partie l'activité de β -D-glucuronidase. Cependant, les concentrations en FeCl_3 , EDTA et ions hypochlorites ne sont pas connues. De même, la concentration en acide férulique reste inconnue alors que la rivière Waikato est bordée sur presque tout son long de nombreux arbres et plantes, et particulièrement dans la ville de Hamilton. Par ailleurs, l'étude de Togo et al. (2006) a également souligné la différence de comportement de l'enzyme vis-à-vis des différents composés chimiques ou biologiques testés selon qu'elle était dans un échantillon d'eau stagnante ou vive. Le cas de la rivière Waikato a cela de particulier, c'est que l'eau y est généralement en circulation, mais peut aussi être retenue aux 8 barrages qu'elle traverse. Il est d'ailleurs probable que ces barrages aient une influence sur les concentrations en *E. coli* et en enzyme (voir 6.1.2). Enfin, il n'est pas exclu que les souches d'*E. coli* présentes dans la rivière

Waikato aient naturellement des taux de β -D-glucuronidase plus faibles. Peut-être que dans cet environnement d'autres voies métaboliques sont privilégiées afin que les bactéries puissent survivre, ou une régulation de l'expression du gène codant GLUC et donc de la production de cette enzyme peut probablement avoir lieu si cette enzyme s'avère non essentielle à la survie d'*E. coli* dans ces eaux. Enfin, une étude a montré que même si GLUC est une enzyme inductible elle est naturellement induite dans des rivières françaises et belges, mais ce n'est peut-être pas le cas en Nouvelle-Zélande, où le climat est très différent (George et al., 2000).

CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

L'accès à l'eau potable est un droit essentiel à la survie de tout être humain, et est aussi l'un des moyens les plus efficaces d'améliorer la santé et de réduire la pauvreté à travers le monde (World Health Organization, 2019). Afin d'assurer la protection des usagers d'eaux récréatives et de sources d'eau potable, il est nécessaire de détecter le plus rapidement possible toute contamination fécale.

Les travaux réalisés lors de ce projet ont montré que la détection automatisée de l'enzyme β -D-glucuronidase permet d'assurer le suivi quasi en temps réel de la qualité bactériologique d'un point d'eau, et de suivre toute la dynamique de la contamination fécale. Cela est notamment très utile pour la gestion des plages afin de fermer et ouvrir la plage concernée aux bons moments. Par ailleurs, sa grande fréquence d'analyse permet de mesurer certains pics de contamination qui n'auraient pas été captés en appliquant les routines de suivi actuelles (prélèvements sporadiques). De plus, la technologie enzymatique automatisée étudiée présente les plus faibles coefficients de variation de l'étude de répétabilité réalisée ici, même si seulement deux échantillons ont été utilisés. Les technologies enzymatiques de détection rapide de contamination fécale semblent ainsi très prometteuses en tant qu'appareils d'alerte précoce, et pourraient permettre une gestion active des eaux récréatives avec un suivi en quasi temps réel de leur qualité microbiologique. La première étape de notre démarche scientifique ayant été l'estimation de la répétabilité expérimentale, donc de la fiabilité des résultats fournis par les différentes techniques employées lors du projet, la précision des résultats obtenus est bonne. Elle est peut-être un peu plus faible pour ceux de la comparaison prenant en compte le délai de 24h de la culture et le hasard, car les seuils enzymatiques ont été définis par itérations manuelles, avec tout de même une précision au dixième de mUFM/100mL près.

Les corrélations linéaires entre le signal enzymatique et les résultats des méthodes de culture ne sont pas toujours très bonnes, mais cela est dû au fait que ces deux techniques ont des cibles différentes. Ainsi, la culture ne peut détecter que les cellules cultivables, or celles-ci ne représentent qu'une fraction des populations bactériennes environnementales, la plupart des microorganismes étant dans un état VBNC. Les technologies enzymatiques peuvent quant à elles détecter toutes les *E. coli* métaboliquement actives et les enzymes β -D-glucuronidase libres. Ces différences sont

aussi mises en avant par les pentes des corrélations entre ces deux entités qui sont toujours inférieures à 1.

L'objectif principal de toutes les méthodes de microbiologie appliquées à l'eau étant d'assurer la sécurité sanitaire des usagers, il apparaît plus judicieux de comparer les méthodes sur leur capacité à protéger les citoyens, c'est-à-dire en imposant des seuils maximums acceptables, que de simplement essayer de trouver une quelconque corrélation entre les méthodes nouvelles et standards. Ainsi, les comparaisons pour la définition des seuils en mUFM/100mL pour chaque site illustrent le fait que la détection enzymatique a les pourcentages de faux-négatifs les plus faibles dans tous les cas étudiés. Une étude comparative prenant en compte les 24h de délai des méthodes de culture ainsi que le facteur chance, a montré que l'accord de décision entre l'activité GLUC du jour i et les résultats de la culture du jour $i-1$ (connus au jour i) est majoritairement dû à la chance. Au contraire, l'accord entre les résultats de l'activité enzymatique et de la culture pour des échantillons prélevés simultanément surpasse le simple accord dû au hasard. Ce projet a donc permis de définir et appliquer à différents jeux de données une nouvelle méthode de comparaison des résultats de culture et enzymatiques en tenant compte des particularités des deux techniques mais aussi de la probabilité d'accord par hasard. L'étude de l'évolution du ratio GLUC/*E. coli* était aussi une nouveauté dans notre équipe qui nous a permis de voir les données et corrélations sous un nouvel angle.

Enfin, de manière plus globale, il apparaît qu'un niveau de contamination plus faible augmente la variabilité des mesures, quelle que soit la méthode employée, et que la part du signal enzymatique due à des enzymes libres n'a que peu d'effet sur les corrélations entre techniques. Néanmoins, ce pourcentage d'enzymes extracellulaires est très différent d'un site à l'autre et dépend de la contamination elle-même : selon qu'il s'agisse d'une contamination ponctuelle ou diffuse, fraîche ou âgée, les résultats de chaque méthode diffèrent, chaque technologie étant plus ou moins impactée par ces changements de "qualité" de contamination.

Au regard des différentes études consultées, il semblerait que peu d'informations soient disponibles sur les corrélations entre l'enzyme β -D-glucuronidase et des agents pathogènes comme les virus ou les protozoaires. En effet, il est reconnu qu'*E. coli* est moins résistante que ces microorganismes pathogènes, et a donc un devenir différent dans l'environnement. Or l'enzyme GLUC est plus persistante dans l'environnement et pourrait peut-être mieux représenter le devenir de ces agents

pathogènes résistants. D'autres tests sur les possibles inhibiteurs des enzymes β -D-glucuronidase, commerciales et issues de l'environnement, pourraient être menés, notamment sur ceux qui pourraient être présents dans le fleuve Saint-Laurent. Un manque d'information concernant tout le métabolisme lié à la production de l'enzyme β -D-glucuronidase par les bactéries *E. coli* a également été relevé, et notamment sur l'impact que certains paramètres environnementaux, comme la température et le pH, peuvent avoir sur ces voies métaboliques. De telles informations permettraient ainsi de mieux appréhender les résultats fournis par des technologies comme le ColiMinder®.

Enfin, le manque de cohérence entre les stratégies de suivi de la qualité microbiologique des eaux récréatives, notamment les différences de fréquence et de protocole d'échantillonnage, impacte les corrélations observées entre GLUC et *E. coli* cultivables, et doit être considéré lors de la comparaison de résultats obtenus sur différents sites. Une harmonisation de ces plans d'échantillonnage, au moins au niveau national, faciliterait la comparaison des résultats de différentes études mais aussi le partage de connaissances entre les équipes mêmes de gestionnaires de plages.

BIBLIOGRAPHIE

9213 Recreational Waters. (2017). Dans *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater*. doi:10.2105/SMWW.2882.187

9223 Enzyme substrate coliform test. (2017). Dans *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater*. doi:10.2105/SMWW.2882.194

Arul, L., Benita, G., & Balasubramanian, P. (2008). Functional insight for β -D-glucuronidase in *Escherichia coli* and *Staphylococcus sp. RLH1*. *Bioinformation*, 2(8), 339-343.

Bain, R., Cronk, R., Wright, J., Yang, H., Slaymaker, T., & Bartram, J. (2014). Fecal contamination of drinking-water in low- and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *PLOS Medicine*, 11(5), 1-23. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4011876/pdf/pmed.1001644.pdf>

Barcina, I., Gonzalez, J. M., Iriberry, J., & Egea, L. (1989). Effect of visible light on progressive dormancy of *Escherichia coli* cells during the survival process in natural fresh water. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(1), 246-251. Tiré de <https://aem.asm.org/content/55/1/246.short>

Bibliomer. (2009). Principe de l'amplification par PCR. 1-4. Tiré de http://bibliomer.ifremer.fr/documents/fiches/fiche_ensavoirplus_lien_PCR_vf.pdf

Burnet, J.-B., Dinh, Q. T., Imbeault, S., Servais, P., Dorner, S., & Prévost, M. (2019). Autonomous online measurement of β -D-glucuronidase activity in surface water: is it suitable for rapid *E. coli* monitoring ? *Water Research*, 152, 10. doi:10.1016

Cabral, J. P. S. (2010). Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7, 3657-3703. doi:10.3390/ijerph7103657

CEAEQ, Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec. (2016). *Recherche et dénombrement d'Escherichia coli thermotolérants dans l'eau : méthode par filtration sur membrane utilisant le milieu de culture mFC-BCIG*. Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les Changements Climatiques (MDDELCC).

Colifast. (2019). Colifast - Rapid, automated and remote microbial testing for water and food safety. Tiré de <http://www.colifast.no/>

Directive 98/83/CE relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine, L 330/32 C.F.R. (1998).

Converse, R. R., Griffith, J. F., Noble, R. T., Haugland, R. A., Schiff, K. C., & Weisberg, S. B. (2012). Correlation between quantitative PCR and culture-based methods for measuring *Enterococcus* spp. over various temporal scales at three California marine beaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 1237-1242. doi:10.1128/AEM.07136-11

Davies, C. M., & Apte, S. C. (1999). Field evaluation of a rapid portable test for monitoring fecal coliforms in coastal waters. *Environmental Toxicology*, 14(3), 355-359. Tiré de [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1522-7278\(199907\)14:3%3C355::AID-TOX9%3E3.0.CO;2-V](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1522-7278(199907)14:3%3C355::AID-TOX9%3E3.0.CO;2-V)

Davies, C. M., & Apte, S. C. (2000). An evaluation of potential interferences in a fluorimetric assay for the rapid detection of thermotolerant coliforms in sewage. *Letters in Applied Microbiology*, 30(2), 99-104. doi:10.1046/j.1472-765x.2000.00677.x

Dorevitch, S., Shrestha, A., DeFlorio-Barker, S., Breitenbach, C., & Heimler, I. (2017). Monitoring urban beaches with qPCR vs. culture measures of fecal indicator bacteria: Implications for public notification. *Environmental Health*, 16(1), 45. doi:10.1186/s12940-017-0256-y

Dorner, S. M., Anderson, W. B., Gaulin, T., Candon, H. L., Slawson, R. M., Payment, P., & Huck, P. M. (2007). Pathogen and indicator variability in heavily impacted watershed. *Journal of Water and Health*, 5(2), 241-257. Tiré de <https://iwaponline.com/jwh/article/5/2/241/31307/Pathogen-and-indicator-variability-in-a-heavily>

Doyle, M. P. (1991). *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 12(4), 289-301. Tiré de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016816059190143D>

Edberg, S. C., & Edberg, M. M. (1988). A defined substrate technology for the enumeration of microbial indicators of environmental pollution. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 61(5), 389-399. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2590433/>

Edberg, S. C., Rice, E. W., Karlin, R. J., & Allen, M. J. (2000). *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 106-116.

Elliot, E. L., & Colwell, R. R. (1985). Indicator organisms for estuarine and marine waters. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 61-79.

Farlex. (édit.). (2019). *The Free Dictionary - Medical Dictionary*.

Farnleitner, A. H., Hocke, L., Beiwl, C., Kavka, G. G., Zechmeister, T., Kirschner, A. K. T., & Mach, R. L. (2001). Rapid enzymatic detection of *Escherichia coli* contamination in polluted river water. *Letters in Applied Microbiology*, 33(3), 246-250. doi:10.1046/j.1472-765x.2001.00990.x

Feng, P. C. S., & Hartman, P. A. (1982). Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(6), 1320-1329. Tiré de <https://aem.asm.org/content/43/6/1320.short>

Fiksdal, L., Pommepuy, M., Caprais, M.-P., & Midttun, I. (1994). Monitoring of fecal pollution in coastal waters by use of rapid enzymatic techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(5), 1581-1584. Tiré de <https://aem.asm.org/content/aem/60/5/1581.full.pdf>

Fiksdal, L., & Tryland, I. (2008). Application of rapid enzyme assay techniques for monitoring of microbial water quality. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 289-294. doi:10.1016/j.copbio.2008.03.004

fluidion. (2016). The fluidion microbiology (*E. coli*) analyzer. Tiré de <http://fluidion.com/fr/produits/alert-system>

Fong, T.-T., & Lipp, E. K. (2005). Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(2), 357-371. doi:10.1128/MMBR.69.2.357-371.2005

Fongaro, G., Padilha, J., Nascimento, M. A., Bampi, G. B., Viancelli, A., & Barardi, C. R. M. (2015). Human and animal enteric virus in groundwater from deep wells, and recreational and network water. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), 20060-20066. doi:<https://doi.org/10.1007/s11356-015-5196-x>

Francy, D. S., Myers, D. N., & Metzker, K. D. (1993). *Escherichia coli* and fecal-coliform bacteria as indicators of recreational water quality. Columbus, Ohio (US): U.S. Department of the interior. Tiré de <https://pubs.usgs.gov/wri/1993/4083/report.pdf>

- Galfi, H., Osterlund, H., Marsalek, J., & Viklander, M. (2016). Indicator bacteria and associated water quality constituents in stormwater and snowmelt from urban catchments. *Journal of Hydrology*, 539, 125-140. doi:10.1016/j.jhydrol.2016.05.006
- Garcia-Armisen, T., Lebaron, P., & Servais, P. (2005). β -D-glucuronidase activity assay to assess viable *Escherichia coli* abundance in freshwaters. *Letters in Applied Microbiology*, 40(4), 278-282. doi:10.1111/j.1472-765X.2005.01670.x
- Garneau, C., & Vanrolleghem, P. (2017). Baignade à la plage de Beauport - Développement d'un modèle de prévision de la qualité de l'eau. *Vecteur Environnement*, 54-59.
- Gauthier, F., & Archibald, F. (2001). The ecology of "fecal indicator" bacteria commonly found in pulp and paper mill water systems. *Water Research*, 35(9), 2207-2218. Tiré de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135400005066>
- George, I., Petit, M., & Servais, P. (2000). Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwaters. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 404-413.
- Hamilton City Council. (2010). *River to the Tap - A guide to Hamilton's Water Supply*. Hamilton, New Zealand: Hamilton City Council. Tiré de <https://www.hamilton.govt.nz/our-services/water/water/Documents/A%20Guide%20to%20Hamilton's%20Water%20Supply.pdf>
- Hamilton City Council. (2013). *Waikato River and Hamilton Treated Water Comprehensive Analysis Report 2013*. Hamilton City Council. Tiré de <https://www.hamilton.govt.nz/our-services/water/water/Documents/City%20Waters%20-%20River%20and%20Water%20Treatment%20Plant%20Comprehensive%20Analysis%20Report.pdf>
- Havelaar, A., Blumenthal, U. J., Strauss, M., Kay, D., & Bartram, J. (2001). *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*. London (UK): World Health Organization (WHO). Tiré de https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/iwachap2.pdf
- Heery, B., Briciu-Burghina, C., Zhang, D., Duffy, G., Brabazon, D., O'Connor, N., & Regan, F. (2015). ColiSense, today's sample today: A rapid on-site detection of β -D-Glucuronidase activity in surface water as a surrogate for *E. coli*. *Talanta*, 148, 75-83. doi:10.1016/j.talanta.2015.10.035

Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., & Vogt, P. H. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 23(3), 504-511. Tiré de <https://www.future-science.com/doi/pdf/10.2144/97233rr01>

Hsu, B.-M., Wu, N.-M., Jang, H.-D., Shih, F.-C., Wan, M.-T., & Kung, C.-M. (2005). Using the flow cytometry to quantify the *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Environmental Monitoring and Assessment*, 104(1-3), 155-162. doi:10.1007/s10661-005-1608-6

IDEXX. (2017). *Colilert*. IDEXX Laboratories, Inc. Tiré de <https://ca.idexx.com/en-ca/water/water-products-services/colilert/>

Ishii, S., & Sadowsky, M. J. (2008). *Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health. *Microbes Environment*, 23(2), 101-108.

ISO, International Organization for Standardization (1998). *Water quality -- Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria -- Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) for the detection and enumeration of E. coli in surface and waste water*. Tiré de <https://www.iso.org/standard/20878.html>

ISO, International Organization for Standardization (2012). *Water quality -- Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria -- Part 2: Most probable number method*. ISO. Tiré de <https://www.iso.org/standard/52246.html>

ISO, International Organization for Standardization (2014). *Water quality -- Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria -- Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora*. ISO. Tiré de <https://www.iso.org/standard/55832.html>

Koschel'nik, J., Vogl, W., Epp, M., & Lackner, M. (2015). Rapid analysis of β -D-glucuronidase activity in water using fully automated technology. *WIT Transactions on Ecology and the Environment*, 196, 471-481. doi:10.2495/WRM150401

Lowery, C. J., Moore, J. E., Millar, B. C., McCorry, K. A. J., Xu, J., & Dooley, J. S. G. (2001). Occurrence and molecular genotyping of *Cryptosporidium* spp. in surface waters in Northern Ireland. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 774-779. Tiré de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2672.2001.01440.x>

MacConkey, A. (1905). Lactose-Fermenting bacteria in faeces. *The Journal of Hygiene*, 5(3), 333-379. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2236133/>

Manafi, M., Kneifel, W., & Bascomb, S. (1991). Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiological Reviews*, 55(3), 335-348. Tiré de <https://mmbr.asm.org/content/55/3/335.short>

Marsh, J. H. (2015, March 4, 2015). Fleuve Saint-Laurent. Tiré de <https://www.thecanadianencyclopedia.ca/fr/article/fleuve-saint-laurent>

McHugh, M. L. (2012). Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemia Medica*, 22(3), 276-282.

Réglement sur la qualité de l'eau potable, Q-2, r. 40 C.F.R. (2014).

Mead, P. S., & Griffin, P. M. (1998). *Escherichia coli* O157:H7. *The Lancet*, 352, 1207-1212. Tiré de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673698012677>

MELCC, Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les Changements Climatiques. (2019). Programme Environnement-Plage. Tiré de <http://www.environnement.gouv.qc.ca/programmes/env-plage/>

MfE, New Zealand Ministry for the Environment, & MoH, New Zealand Ministry of Health. (2003). *Microbiological Water Quality Guidelines for Marine and Freshwater Recreational areas* (Publication n° ME 474). Wellington, New Zealand. Tiré de <http://www.mfe.govt.nz/publications/fresh-water/microbiological-water-quality-guidelines-marine-and-freshwater-recreatio-14>

microLAN. BACTcontrol: online monitoring of bacteria in water. Tiré de <http://www.microlan.nl/monitoring-products/bactcontrol-online-monitor-of-total-and-specific-bacteria-activity-in-water/>

Ministry for the Environment of New Zealand. (2009, October 8, 2009). Microbiological water quality guidelines for recreational water - frequently asked questions. Tiré de <http://www.mfe.govt.nz/fresh-water/tools-and-guidelines/microbiological-guidelines-recreational-water>

Drinking-water Standards for New Zealand 2005 (Revised 2008) (2008).

Muirhead, R. W., & Meenken, E. D. (2018). Variability of *Escherichia coli* concentrations in rivers during base-flow conditions in New Zealand. *Journal of Environmental Quality*. doi:10.2134/jeq2017.11.0458

Muller-Niklas, G., & Herndl, G. J. (1992). Activity of fecal coliform bacteria measured by 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide substrate in the northern Adriatic Sea with special reference to marine snow. *Marine Ecology Progress Series*, 89, 305-309. Tiré de https://www.jstor.org/stable/24831799?seq=1#page_scan_tab_contents

New Hampshire Department of Environmental Services. (2003). Fecal Coliform as an Indicator Organism. *Environmental Fact Sheet*, 1-3. Tiré de <https://www.des.nh.gov/organization/commissioner/pip/factsheets/wwt/documents/web-18.pdf>

Odonkor, S., & Ampofo, J. K. (2013). *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. *Microbiology Research*, 4(2), 5-11. doi:10.4081/mr.2013.e2

Pardee, A. B., & Prestidge, L. S. (1961). The initial kinetics of enzyme induction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 49(1), 77-88. Tiré de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000630026190871X>

Directive 2006/7/CE concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade et abrogeant la directive 76/160/CEE (2006).

Pathogen Detection Systems, Inc. (2017). TECTA-PDS - TECTA™ B16 Instrument. Tiré de <http://www.tecta-pds.ca/product/tecta-b16-instrument/>

Petit, M., George, I., & Servais, P. (2000). Survival of *Escherichia coli* in freshwater: β -D-Glucuronidase activity measurements and characterization of cellular states. *Can. J. Microbiol.*, 46(7), 679-684. doi:<https://doi.org/10.1139/w00-040>

Poitras, E., & Houde, A. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*, 2(2), 2-11. Tiré de <https://biochimie.umontreal.ca/wp-content/uploads/sites/37/2015/07/qPCR.pdf>

Prats, J., Garcia-Armisen, T., Larrea, J., & Servais, P. (2008). Comparison of culture-based methods to enumerate *Escherichia coli* in tropical and temperate freshwaters. *Letters in Applied Microbiology*, 46, 243-248. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02292.x>

Ramirez-Castillo, F. Y., Loera-Muro, A., Jacques, M., Garneau, P., Avelar-Gonzalez, F. J., Harel, J., & Guerrero-Barrera, A. L. (2015). Waterborne pathogens: detection methods and challenges. *Pathogens*, 4, 307-334. doi:10.3390/pathogens4020307

Rice, E. W., Allen, M. J., & Edberg, S. C. (1990). Efficacy of β -glucuronidase assay for identification of *Escherichia coli* by the Defined-Substrate Technology. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(5), 1203-1205. Tiré de <https://aem.asm.org/content/56/5/1203.short>

Ritchie, H., & Donnison, A. (2010). *Faecal contamination of rural Waikato waterways - Sources, survival, transport and mitigation opportunities*. Hamilton (New Zealand): Environment Waikato.

Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin, M.-R., & Laurent, P. (2002). Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 49(1), 31-54. Tiré de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701201003517>

Ryzinska-Paier, G., Lendenfeld, T., Correa, K., Stadler, P., Blaschke, A. P., Mach, R. L., Farnleitner, A. H. (2014). A sensitive and robust method for automated on-line monitoring of enzymatic activities in water and water resources. *Water Science and Technology*, 69(6), 1349-1358. doi:10.2166/wst.2014.032

Santé Canada. (2012a). *Recommandations au sujet de la qualité des eaux utilisées à des fins récréatives au Canada* (Publication n° H129-15/2012F). Ottawa (Ontario): Santé Canada. Tiré de <https://www.canada.ca/content/dam/canada/health-canada/migration/healthy-canadians/publications/healthy-living-vie-saine/water-recreational-recreative-eau/alt/pdf/water-recreational-recreative-eau-fra.pdf>

Santé Canada. (2012b). *Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : Document technique - Escherichia coli* (Publication n° H144-7/2013F-PDF). Ottawa (Ontario): Santé Canada. Tiré de <https://www.canada.ca/content/dam/canada/health-canada/migration/healthy-canadians/publications/healthy-living-vie-saine/water-ecoli-eau/alt/water-ecoli-eau-fra.pdf>

Santé Canada. (2012c). *Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada: Document technique - Les protozoaires entériques: Giardia et Cryptosporidium* (Publication n° 130030). Ottawa, Ontario (Canada): Santé Canada. Tiré de <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/sante-environnement-milieu-travail/rapports-publications/qualite-eau/protozoaires-enteriques-giardia-cryptosporidium.html#a6>

Santé Canada. (2013). *Conseils sur les bactéries pathogènes d'origine hydrique* (Publication n° H129-25/1-2014F-PDF). Ottawa, Ontario (Canada): Bureau de la qualité de l'eau et de l'air, Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs, Santé Canada. Tiré de <https://www.canada.ca/content/dam/canada/health-canada/migration/healthy-canadians/publications/healthy-living-vie-saine/water-pathogens-pathogenes-eau/alt/water-pathogens-pathogenes-eau-fra.pdf>

Santé Canada. (2017). *Les virus entériques dans l'eau potable - Document de consultation publique* Ottawa, Ontario (Canada): Santé Canada. Tiré de <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/programmes/consultation-virus-enteriques-eau-potable/document.html#6.1>

Servais, P., Prats, J., Passerat, J., & Garcia-Armisen, T. (2009). Abundance of culturable versus viable *Escherichia coli* in freshwater. *Can. J. Microbiol.*, 55, 905-909. doi:10.1139/W09-043

Shanks, O. C., Kelty, C. A., Oshiro, R., Haugland, R. A., Madi, T., Brooks, L., Sivaganensan, M. (2016). Data acceptance criteria for standardized human-associated fecal source identification quantitative real-time PCR methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(9), 2773-2782. doi:10.1128/AEM.03661-15

Sigma-Aldrich. 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide hydrate for identification of transformed plants. Tiré de <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/4-methylumbelliferyl-beta-d-glucuronide-hydrate.html>

Sigma-Aldrich. (1998). Enzymatic Assay of β -Glucuronidase (EC 3.2.1.31) from *E. coli*. Tiré de <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-beta-glucuronidase-from-ecoli.html>

Sigma-Aldrich. (2019). Brilliant Green Bile Lactose Broth. Tiré de <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/16025?lang=en®ion=US>

Stadler, P., Blöschl, G., Vogl, W., Koschelnik, J., Epp, M., Lackner, M., Zessner, M. (2016). Real-time monitoring of β -D-glucuronidase activity in sediment laden streams: a comparison of prototypes. *Water Research*, 101, 252-261. doi:10.1016/j.watres.2016.05.072

Stokell, J. R., & Steck, T. R. (2012). Viable but Nonculturable Bacteria. *eLS*. doi:<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000407.pub2>

Stokell, J. R., & Steck, T. R. (2012). Viable but Nonculturable Bacteria. *eLS*. doi:<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000407.pub2>

Stott, R., Davies-Colley, R., Nagels, J., Donnison, A., Ross, C., & Muirhead, R. W. (2011). Differential behaviour of *Escherichia coli* and *Campylobacter* spp. in a stream draining dairy pasture. *Journal of Water and Health*, 9(1), 59-69. doi:10.2166/wh.2010.061

Straub, T. M., & Chandler, D. P. (2003). Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, 53, 185-197. doi:10.1016/S0167-7012(03)00023-X

Thermo Scientific. (2019). *Brilliance E. coli/Coliform selective agar*. Tiré de http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1046&org=71

Togo, C. A., Wutor, V. C., & Pletschke, B. I. (2006). Properties of in situ *Escherichia coli* β -D-glucuronidase (GUS): evaluation of chemical interference on the direct enzyme assay for faecal pollution detection in water. *African Journal of Biotechnology*, 5(22), 2338 - 2344. Tiré de <http://www.academicjournals.org/AJB>

Trigui, H., & Prévost, M. (2019). [Eléments avancés de microbiologie environnementale - Cours 2: Rappels biomoléculaires 2].

Tryland, I., & Fiksdal, L. (1998). Enzyme characteristics of β -D-Galactosidase- and β -D-glucuronidase-positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(3), 1018-1023. Tiré de <https://aem.asm.org/content/aem/64/3/1018.full.pdf>

U.S. EPA, United States Environmental Protection Agency. (1986a). *Bacteriological ambient water quality criteria for marine and fresh recreational waters* (Publication n° 440584002). U.S. EPA. Tiré de <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/00001M74.txt?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1981%20Thru%201985&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&UseQField=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5CZYFILES%5CINDEX%20DATA%5C81THRU85%5CTXT%5C00000001%5C00001M74.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Di>

[splay=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=7#](#)

Method 9131: Total coliform: multiple tube fermentation technique (1986b).

U.S. EPA, United States Environmental Protection Agency (2002). *Method 1604: Total Coliforms and Escherichia coli in Water by Membrane Filtration Using a Simultaneous Detection Technique (MI Medium)*. EPA 821-R-02-024. Washington DC. U.S. EPA Office of Water.

U.S. EPA, United States Environmental Protection Agency (2005a). *Method 1622: Cryptosporidium in water by Filtration/IMS/FA*. United States. Tiré de <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-1622.pdf>

U.S. EPA, United States Environmental Protection Agency (2005b). *Method 1623: Cryptosporidium and Giardia in water by filtration/IMS/FA*. United States.

U.S. EPA, United States Environmental Protection Agency (2006). *Method 1681: Fecal coliforms in sewage sludge (biosolids) by multiple-tube fermentation using A-1 medium*, EPA-821-R-06-013 C.F.R. United States.

U.S. EPA, United States Environmental Protection Agency (2009). National Primary Drinking Water Regulations, EPA 816-F-09-004 C.F.R. United States.

U.S. EPA, United States Environmental Protection Agency (2010). *Method 1680: Fecal Coliforms in sewage sludge (biosolids) by multiple-tube fermentation using Lauryl Tryptose Broth (LTB) and EC medium*, EPA-821-R-10-003 C.F.R. United States.

U.S. EPA, United States Environmental Protection Agency (2012). Recreational Water Quality Criteria, EPA-820-F-12-058 C.F.R. United States.

UNICEF. (2017). *UNICEF Target Product Profile : Rapid E. coli Detection*.

Voge, G. (2002, 3 juillet 2002). La PCR - Principe. Tiré de <http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/principe/principe.htm>

VWM, Vienna Water Monitoring Solutions (2017). ColiMinder® - Industrial - CMI-01. 8, 1-2. Tiré de https://www.v-w-m.at/wp-content/uploads/2018/01/ColiMinder_Industrial_V1_10_JK_en.pdf

Wade, T. J., Calderon, R. L., Sams, E., Beach, M. J., Brenner, K. P., Williams, A. H., & Dufour, A. P. (2006). Rapidly measured indicators of recreational water quality are predictive of

swimming-associated gastrointestinal illness. *Environmental Health Perspectives*, 114(1), 24-28. doi:doi.org/10.1289/ehp.8273

Walker, D. I., McQuillan, J., Taiwo, M., Parks, R., Stenton, C. A., Morgan, H., Lees, D. N. (2017). A highly specific *Escherichia coli* qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. *Water Research*, 126, 101-110. doi:10.1016/j.watres.2017.08.032

Wang, Z., Vora, G. J., & Stenger, D. A. (2004). Detection and genotyping of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* by oligonucleotide microarray. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7), 3262-3271. doi:10.1128/JCM.42.7.3262-3271.2004

Watkins, J., & Jian, X. (1997). Cultural methods of detection for microorganisms: recent advances and successes. Dans D. W. Sutcliffe (édit.), *The microbiological quality of water* (p. 19-27). Ambleside, UK: Freshwater Biological Association.

Whitman, R. L., & Nevers, M. B. (2004). *Escherichia coli* sampling reliability at a frequently closed Chicago beach: monitoring and management implications. *Environmental Science and Technology*, 38(16), 4241-4246. doi:10.1021/es034978i

World Health Organization. (2003). *Guidelines for safe recreational water environments - Volume 1: coastal and fresh waters*. Geneva (Switzerland) : World Health Organization.

World Health Organization. (2011). *Guidelines for drinking-water quality* (Rapport n° WA 675). Geneva (Switzerland): World Health Organization. Tiré de https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44584/9789241548151_eng.pdf?sequence=1

World Health Organization. (2018a). *A global overview of national regulations and standards for drinking-water quality* (Rapport n° ISBN 978-92-4- 151376-0). Geneva (Switzerland): World Health Organization. Tiré de <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272345/9789241513760-eng.pdf?ua=1>

World Health Organization. (2018b). *WHO recommendations on scientific, analytical and epidemiological developments relevant to the parameters for bathing water quality in the Bathing Water Directive (2006/7/EC)*. Geneva (Switzerland): World Health Organization. Tiré de <https://circabc.europa.eu/d/d/workspace/SpacesStore/9e89152c-7cfe-4391-9bcf-c173519e8181/WHO%20Recommendations%20on%20EC%20BWD.pdf>

World Health Organization. (2019). Water sanitation hygiene - Water safety and quality. Tiré de https://www.who.int/water_sanitation_health/water-quality/en/

World Health Organization, & OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development (2003). Analytical methods for microbiological water quality testing. Dans A. Dufour, M. Snozzi, W. Koster, J. Bartram, E. Ronchi, & F. L. (édit.), *Assesing microbial safety for drinking water: improving approaches and methods* (p. 237-292). Tiré de https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/assessing-microbial-safety-of-drinking-water/en/

World Health Organization (WHO), & the United Nations Children's Fund (UNICEF). (2017). *Progress on drinking water, sanitation and hygiene: 2017 update and SDG baselines*. Switzerland: World Health Organization, UNICEF. Tiré de <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258617/9789241512893-eng.pdf?sequence=1>

Wu, J., Long, S. C., Das, D., & Dorner, S. M. (2011). Are microbial indicators and pathogens correlated? A statistical analysis of 40 years of research. *Journal of Water and Health*, 9(2), 265-278. doi:10.2166/wh.2011.117

ZAPS Technologies. (2014). *E. coli* - Monitoring with the LiqID™ Station. *LiqID™ How it works*, 1-2. Tiré de <http://www.zapstechnologies.com/parameters/e-coli/>

ZAPS Technologies. (2018). The LiqID Station. Tiré de <http://www.zapstechnologies.com/the-liquid-station/>

ANNEXE A RÉSUMÉ DE LA DÉMARCHE SCIENTIFIQUE

1) Analyse du signal enzymatique
<ul style="list-style-type: none"> • Répétabilité 2 échantillons de niveaux de contamination différents, 10 répliques, 5 techniques : ColiMinder®, TECTA™ B16, Colilert, culture sur milieu MI agar et mFC BCIG. • Signal en phase soluble Analyse au ColiMinder® d'échantillons avant et après filtration sur filtre 0,22 µm. • Ratio GLUC/<i>E. coli</i> Calcul du ratio GLUC/<i>E. coli</i> après analyse d'échantillons par culture et par ColiMinder®, et tracé de son évolution en fonction des concentrations en <i>E. coli</i> cultivables.
2) Application du ColiMinder® aux eaux récréatives
<ul style="list-style-type: none"> • Corrélations linéaires Tracé de l'évolution du signal enzymatique en fonction des concentrations en <i>E. coli</i> cultivables après analyse d'échantillons par culture et par ColiMinder®. • Analyses par définition de seuils limites Estimation par calcul de matrices de confusion des seuils maximaux d'activité enzymatique équivalents aux seuils en cultivables des réglementations, pour chaque site étudié. Comparaison de l'accord des décisions de gestion de plage entre méthode de culture et technologie enzymatique automatisée par le calcul des pourcentages de faux-négatifs et faux-positifs, et du coefficient kappa de Cohen pour tenir compte du hasard.
3) Suivi d'évènement
<p>Suivi d'un évènement de pluie avec débordement d'une surverse d'égouts : mesures des <i>E. coli</i> cultivables et du signal enzymatique en simultané, à chaque heure, pendant plus de 24h.</p>